



INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

| | | |
|---|----|--|
| (51) International Patent Classification: C12N 15/00, C12N 9/64, G01N 33/53 | A2 | (11) International Publication Number: WO 00/56871 (43) International Publication Date: 28 September 2000 (28.09.2000) |
|---|----|--|

| | |
|---|---|
| (21) International Application Number: PCT/EP00/02018 (22) International Filing Date: 08 March 2000 (08.03.2000) (30) Priority Data: 199 10 108.6 08 March 1999 (08.03.1999) DE (60) Parent Application or Grant FAHRENHOLZ, Falk [/]; O. POSTINA, Rolf [/]; O. FAHRENHOLZ, Falk [/]; O. POSTINA, Rolf [/]; O. ISENBRUCK, Günter; O. | Published BEST AVAILABLE COPY |
|---|---|

(54) Title: CELLS COEXPRESSING AN AMYLOID PRECURSOR PROTEIN AND AN 'alpha'-SECRETASE AND THEIR USES IN TEST METHODS AND DIAGNOSTICS

(54) Titre: CELLULES COEXPRIMANT UNE PROTEINE PRECURSEUR AMYLOIDE ET UNE 'alpha'-SECRETASE, ET LEURS UTILISATIONS DANS DES METHODES D'ESSAI ET A DES FINS DE DIAGNOSTIC

(57) Abstract

The invention relates to a recombinant cell which expresses a substrate protein comprising at least one sequence region of 18 amino acids of the human amyloid precursor protein (APP) or a homologous protein. The sequence region contains the 'alpha'-secretase cleavage site as well as 6 amino acid rests at the amino terminal and 12 amino acid rests at the carboxy terminal, in relation to the 'alpha'-secretase cleavage site, and contains either a) a recombinant nucleic acid comprising at least one gene for a protease protein which contains either the sequence region(s), required for proteolytic action, of the disintegrin metalloprotease ADAM 10 obtained from cattle (Bos taurus), humans or another mammal or represents a mutein of a mammalian disintegrin metalloprotease ADAM 10 which has essentially the same enzymatic properties, the gene or genes being controlled by a heterologous promotor; or b) heterologous RNA coding for a substrate protein and a protease protein. The invention also relates to the use of the above cells.

(57) Abrégé

L'invention concerne une cellule recombinée exprimant une protéine substrat comprenant au moins une zone séquentielle de 18 aminoacides de la protéine précurseur amyloïde humaine (APP, amyloid precursor protein) ou une protéine homologue. La zone séquentielle comprend le point de clivage de la 'alpha'-sécrétase, ainsi que 6 restes aminoacide aminé-terminaux et 12 restes d'acide carboxy-terminaux par rapport au point de clivage de la 'alpha'-sécrétase, et a) contient soit l'acide nucléique recombiné comprenant au moins un gène pour une protéine protéase qui comprend au moins la(les) zone(s) séquentielle(s) de disintégrine-métalloprotéase ADAM 10 issue du boeuf (Bos taurus), de l'homme ou d'un autre mammifère, ou bien représente une mutéine d'une disintégrine-métalloprotéase ADAM 10 de mammifère, possédant sensiblement les mêmes propriétés enzymatiques, le gène ou les gènes se trouvant sous le contrôle d'un promoteur hétérologue; b) soit l'ARN hétérologue codant une protéine substrat et une protéine protéase. L'invention concerne en outre différentes utilisations de ces cellules.

PCTWELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

| | | |
|---|--|---|
| (51) Internationale Patentklassifikation ⁷ : C12N 15/00, 9/64, G01N 33/53 | A2 | (11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/56871 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 28. September 2000 (28.09.00) |
| (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/02018 (22) Internationales Anmeldedatum: 8. März 2000 (08.03.00) (30) Prioritätsdaten: 199 10 108.6 8. März 1999 (08.03.99) DE (71)(72) Anmelder und Erfinder: FAHRENHOLZ, Falk (DE/DE); An der Klosterheck 17, D-55130 Mainz (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): POSTINA, Rolf (DE/DE); Jahnstrasse 16, D-64380 Roßdorf (DE). (74) Anwalt: ISENBRUCK, Günter; Buntehle Pagenberg Dost Altenburg Geissler Isenbruck, Thendör-Heuss-Anlage 12, D-68165 Mannheim (DE). | (81) Bestimmungsstaaten: AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG). Veröffentlicht Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts. | |
| (54) Title: CELLS COEXPRESSING AN AMYLOID PRECURSOR PROTEIN AND AN α -SECRETASE AND THEIR USES IN TEST METHODS AND DIAGNOSTICS | | |
| (54) Bezeichnung: ZELLEN, DIE EIN AMYLOIDVORLÄUFERPROTEIN UND EIN α -SEKRETASE COEXPRIMIEREN UND DEREN ANWENDUNGEN IN TESTVERFAHREN UND DIAGNOSTIK | | |
| (57) Abstract | | |
| <p>The invention relates to a recombinant cell which expresses a substrate protein comprising at least one sequence region of 18 amino acids of the human amyloid precursor protein (APP) or a homologous protein. The sequence region contains the α-secretase cleavage site as well as 6 amino acid rests at the amino terminal and 12 amino acid rests at the carboxy terminal, in relation to the α-secretase cleavage site, and contains either a) a recombinant nucleic acid comprising at least one gene for a protease protein which contains either the sequence region(s), required for proteolytic action, of the disintegrin metalloprotease ADAM 10 obtained from cattle (<i>Bos taurus</i>), humans or another mammal or represents a mutein of a mammalian disintegrin metalloprotease ADAM 10 which has essentially the same enzymatic properties, the gene or genes being controlled by a heterologous promoter; or b) heterologous RNA coding for a substrate protein and a protease protein. The invention also relates to the use of the above cells.</p> | | |
| (57) Zusammenfassung | | |
| <p>Die Erfindung betrifft eine rekombinante Zelle, die ein Substratprotein exprimiert, das mindestens einen Sequenzbereich von 18 Aminosäuren des humanen Amyloidvorläuferproteins (APP, amyloid precursor protein) oder eines homologen Proteins umfasst, wobei der Sequenzbereich die α-Sekretasespaltstelle sowie 6 Aminosäurereste aminoterminal und 12 Aminosäurereste carboxyterminal bezogen auf die α-Sekretasespaltstelle enthält, und a) entweder rekombinante Nukleinsäure enthält, umfassend mindestens ein Gen für ein Proteaseprotein, das entweder mindestens den/die für die proteolytische Aktivität notwendigen Sequenzbereich oder Sequenzbereiche der Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 aus dem Rind (<i>Bos taurus</i>), aus dem Menschen oder aus einem anderen Säugetier umfasst oder ein Mutein einer Säugetier Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 darstellt, das im wesentlichen die gleichen enzymatischen Eigenschaften besitzt, wobei das Gen oder die Gene unter der Kontrolle eines heterologen Promotors stehen, b) oder heterologe RNA codierend für ein Substratprotein und für ein Proteaseprotein. Die Erfindung betrifft weiterhin diverse Anwendungen der Zellen.</p> | | |

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

| | | | | | | | |
|----|------------------------------|----|-----------------------------------|----|---|----|--------------------------------|
| AL | Albanien | ES | Spanien | LS | Lesotho | SI | Slowenien |
| AM | Armenien | FI | Finnland | LT | Litauen | SK | Slowakei |
| AT | Österreich | FR | Frankreich | LU | Luxemburg | SN | Senegal |
| AU | Australien | GA | Gabun | LV | Lettland | SZ | Swasiland |
| AZ | Aserbaidschan | GB | Vereinigtes Königreich | MC | Monaco | TD | Tschad |
| BA | Bosnien-Herzegowina | GE | Georgien | MD | Republik Moldau | TG | Togo |
| BB | Barbados | GH | Ghana | MG | Madagaskar | TJ | Tadschikistan |
| BE | Belgien | GN | Guinea | MK | Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien | TM | Turkmenistan |
| BF | Burkina Faso | GR | Griechenland | ML | Mali | TR | Türkei |
| BG | Bulgarien | HU | Ungarn | MN | Mongolei | TT | Trinidad und Tobago |
| BJ | Benin | IE | Irland | MR | Mauretanien | UA | Ukraine |
| BR | Brasilien | IL | Israel | MW | Malawi | UG | Uganda |
| BY | Belarus | IS | Island | MX | Mexiko | US | Vereinigte Staaten von Amerika |
| CA | Canada | IT | Italien | NE | Niger | UZ | Usbekistan |
| CF | Zentralafrikanische Republik | JP | Japan | NL | Niederlande | VN | Vietnam |
| CG | Kongo | KE | Kenia | NO | Norwegen | YU | Jugoslawien |
| CH | Schweiz | KG | Kirgisistan | NZ | Neuseeland | ZW | Zimbabwe |
| CI | Côte d'Ivoire | KP | Demokratische Volksrepublik Korea | PL | Polen | | |
| CM | Kamerun | KR | Republik Korea | PT | Portugal | | |
| CN | China | KZ | Kasachstan | RO | Rumänien | | |
| CU | Kuba | LC | St. Lucia | RU | Russische Föderation | | |
| CZ | Tschechische Republik | LJ | Liechtenstein | SD | Sudan | | |
| DE | Deutschland | LK | Sri Lanka | SE | Schweden | | |
| DK | Dänemark | LR | Liberia | SG | Singapur | | |
| EE | Estland | | | | | | |

Description

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

ZELLEN, DIE EIN AMYLOIDVORLÄUFERPROTEIN UND EIN α -SEKRETASE COEXPRIMIEREN UND
DEREN ANWENDUNGEN IN TESTVERFAHREN UND DIAGNOSTIK

10

Die Erfindung betrifft zunächst Zellen, die rekombinierte Nukleinsäure(n) enthalten, die ein Amyloidvorläuferprotein (APP) und eine α -Sekretase codieren, oder zumindest Teile der genannten Proteine, ferner ein Testverfahren zur Identifikation α -Sekretase-aktiver Substanzen sowie eines zur Identifikation weiterer Sekretasen, schließlich auch ein Verfahren zur Bestimmung der Anfälligkeit gegenüber neurodegenerativen Erkrankungen, insbesondere gegenüber *Morbus Alzheimer* sowie die Verwendung von Nukleinsäuren, die für eine α -Sekretase codieren, für die Gentherapie.

Morbus Alzheimer ist die häufigste Ursache für Demenz in der westlichen Welt und die vierthäufigste Todesursache in den USA.

Die *Alzheimer*-Inzidenz steigt mit dem Alter: 1 bis 5 % der Menschen über 65 und 10 bis 20 % über 80 sind betroffen.

Alzheimer ist neuropathologisch durch die Anwesenheit einer Vielzahl von neurotischen Plaques und neurofibrilären Fehlstrukturen gekennzeichnet, die zu einem massiven Verlust an Neuronen führt. Weder die Plaques noch die neurofibrilären Fehlstrukturen sind spezifisch für *Alzheimer* – sie kommen bei älteren, intellektuell unauffälligen Personen und bei gewissen anderen Krankheiten ebenfalls vor. Allerdings sind diese Strukturen bei *Alzheimer* zahlreicher und weiter verbreitet als bei nicht betroffenen Individuen. Während Plaques extrazellulär auftreten,

5 findet man die neurofibrilären Fehlstrukturen in degenerierenden Neuronen. Der
Hauptbestandteil der Plaques ist ein 39-43 Aminosäure (4kDa) großes Peptid,
10 genannt β -Amyloid oder einfach β -Peptid ($A\beta$). Ein Mikrotubuli-assoziiertes
Protein, Tau, ist der Hauptbestandteil der neurofibrilären Fehlstrukturen (Über-
blick: Encyclopedia of Molecular Biology and Molecular Medicine, Band 1, Sei-
5 ten 42 bis 52, Herausgeber Meyers, Robert A., VCH Verlag Weinheim)

15 Das β -Peptid ($A\beta$) stammt von dem Amyloidvorläuferprotein (amyloid precursor
protein, APP) ab, einem Typ I Transmembranprotein, das in vielen Säugerzellty-
20 pen exprimiert wird.

Die $A\beta$ -Sequenz umfaßt 28 Aminosäuren des extrazellulären und 12 bis 15 Ami-
nosäurereste des membrandurchspannenden Teils von APP. $A\beta$ wird aus APP
25 mittels proteolytischer Prozessierung durch eine bisher nicht identifizierte Pro-
tease gebildet, der β -Sekretase, die am Aminoterminal schneidet und durch die
15 am C-Terminus schneidende γ -Sekretase.

30 Der Hauptabbauweg von APP ist der konstitutive sekretorische Weg, der die
Spaltung des Proteins innerhalb der $A\beta$ -Sequenz durch eine putative α -Sekretase
20 an der Zelloberfläche (Sisodia, S.S., (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, Seiten
6075 bis 6079; Haass et al. (1992) Nature 357, Seiten 500 bis 503; Ikezu et al.
35 (1998) J. Biol. Chem. 273, Seiten 10485 bis 10495) und im Trans-Golgi-System
(Kuentzel et al. (1993) Biochem. J. 295, Seiten 367 bis 378; De Strooper et al.
(1993) J. Cell Biol. 121, Seiten 295 bis 304; Sambamurti et al. (1992) J. Neurosci.
40 Res. 33, Seiten 319 bis 329; Haass, et al. (1995) J. Cell. Biol. 128, Seiten 537
25 bis 547; Tomita et al. (1998) J. Biol. Chem. 273, Seiten 6277 bis 6284) umfaßt. Lös-
liche aminoterminal APP-Fragmente von 105 bis 125 kDa (sogenannte APP_{sol}-
45 Fragmente; Weidemann et al. (1989) Cell 57, Seiten 115 bis 126; Evin et al.
(1994) Amyloid: Int. J. Exp. Clin. Invest. 1, Seiten 263 bis 280) werden ins extra-
30 zelluläre Medium freigesetzt. Das membrangebundene 10kDa große carboxyter-
minale Fragment (p10), das bei der α -Sekretase-Spaltung ebenfalls entsteht, ent-
50 hält nur einen Teil des amyloidogenischen $A\beta$ -Peptids und kann durch die γ -

5 Sekretase zu einem 3kDa-Fragment (p3) weiter abgebaut werden (Haass et al.
10 (1993) J. Biol. Chem. 268, Seiten 3021 bis 3024). Da der Abbau von APP durch
eine α -Sekretase zu keinem intakten A β -Peptid führt, ist er nicht amyloidoge-
nisch, d.h. er führt nicht zur Bildung von Amyloidplaques und somit nicht zu
5 *Morbus Alzheimer*.

15 Aus diesem Grund steht der α -Sekretase-Abbau von APP seit Jahren im Fokus
des Forscherinteresses. Durch Boseman et al. (1994) (J. Biol. Chem. 269, Seiten
3111 bis 3116) wurde ein Fusionsprotein aus dem aminoterminalen Teil von APP
20 und einer alkalischen Phosphatase in H4-Zellen heterolog exprimiert, um die en-
dogene α -Sekretaseaktivität dieser Zellen zu untersuchen und gegebenenfalls das
entsprechende Protein zu identifizieren. Hierbei wurde der unter verschiedenen
Bedingungen freigesetzte Anteil an Proteolyseprodukt mit Antikörpern bestimmt,
25 die gegen alkalische Phosphatase gerichtet waren. Diese Versuche führten bisher
nicht zur Identifikation der α -Sekretase. Vermutlich ist die Menge an endogener
 α -Sekretase zu gering, als daß eine direkte Isolierung und Identifikation der α -
Sekretase möglich wäre.

30 Es ist Aufgabe der Erfindung, Zellen bereitzustellen, die in der Lage sind, ein
Amyloidvorläuferprotein und eine α -Sekretase in ungewöhnlich großer Menge zu
25 exprimieren. Eine weitere Aufgabe ist es, Zellen bereitzustellen, deren endogene
 α -Sekretaseaktivität vermindert ist. Es ist ferner Aufgabe der Erfindung, ein Ver-
fahren zur Auffindung pharmazeutischer Wirksubstanzen anzugeben, die in den
 α -Sekretasestoffwechsel eingreifen, sowie ein Verfahren zur Identifizierung wei-
40 terer Sekretasen. Schließlich ist Aufgabe der Erfindung, ein weiteres Verfahren
zur Bestimmung der Anfälligkeit gegenüber neurodegenerativen Erkrankungen,
insbesondere gegenüber *Morbus Alzheimer* anzugeben sowie ein Arzneimittel
gegen neurodegenerative Erkrankungen, insbesondere gegen *Morbus Alzheimer*
45 bereitzustellen. Ferner sollen Tiermodelle wie transgene nicht-menschliche Tiere
zum Studium von neurodegenerativen Erkrankungen, insbesondere von *Morbus*
30 *Alzheimer* bereitgestellt werden.

50 Die Erfindung besteht in einer rekombinanten Zelle, die

ein Substratprotein exprimiert, das mindestens einen Sequenzbereich von 18 Aminosäuren des humanen Amyloidvorläuferproteins (APP, amyloid precursor protein) oder eines homologen Proteins umfaßt, wobei der Sequenzbereich die α -Sekretasespaltstelle sowie 6 Aminosäurereste aminoterminal und 12 Aminosäurereste carboxyterminal bezogen auf die α -Sekretasespaltstelle enthält, und

- entweder rekombinante Nukleinsäure enthält, umfassend mindestens ein Gen für ein Proteaseprotein, das entweder mindestens den/die für die proteolytische Aktivität notwendigen Sequenzbereich oder Sequenzbereiche der Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 aus dem Rind (*Bos taurus*), aus dem Menschen oder aus einem anderen Säugetier umfaßt oder ein Mutein einer Säugetier Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 darstellt, das im wesentlichen die gleichen enzymatischen Eigenschaften besitzt, wobei das Gen oder die Gene unter der Kontrolle eines heterologen Promotors stehen,
- oder heterologe RNA codierend für ein Substratprotein und für ein Proteaseprotein.

Eine weitere Ausführungsform betrifft eine rekombinante Zelle, die rekombinante Nukleinsäure enthält, umfassend entweder

- mindestens ein Gen für ein Substratprotein, das mindestens einen Sequenzbereich von 18 Aminosäuren des humanen Amyloidvorläuferproteins (APP, amyloid precursor protein) oder eines homologen Proteins umfaßt, wobei der Sequenzbereich die α -Sekretasespaltstelle sowie 6 Aminosäurereste aminoterminal und 12 Aminosäurereste carboxyterminal bezogen auf die α -Sekretasespaltstelle enthält, und
- mindestens ein Gen für ein Proteaseprotein, das entweder mindestens den/die für die proteolytische Aktivität notwendigen Sequenzbereich oder Sequenzbereiche der Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 aus dem Rind (*Bos taurus*), aus dem Menschen oder aus einem anderen Säugetier umfaßt oder ein Mutein einer Säugetier Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 darstellt, das im wesentlichen die gleichen enzymatischen Ei-

5 genschaften besitzt, wobei das Gen oder die Gene unter der Kontrolle ei-
nes heterologen Promotors stehen,
10 oder heterologe RNA codierend für ein Substratprotein und für ein Proteasepro-
tein.

5

15 Es wurde überraschenderweise gefunden, daß die an sich schon bekannte Disinte-
grin-Metalloprotease ADAM 10 die Eigenschaften der authentischen α -Sekretase
aufweist. Die Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 aus dem Rind wurde zuerst
10 von Chantry et al. (1989) (J. Biol. Chem. 264, Seiten 21603 bis 21607) gereinigt
und von Howard et al. (1996) (Biochem. J. 317, Seiten 45 bis 50, Gen-
Bank/EMBL-Datenbank-Zugangsnummer Z21961) kloniert. Auch das Homologe
des Menschen ist kloniert (Rosendahl et al. (1997), J. Biol. Chem. 272 (39), Sei-
ten 24588 bis 24593, GenBank/EMBL-Datenbank-Zugangsnummer AF009615).

25 Es war bisher unbekannt, was das natürliche Substrat beider Enzyme *in vivo* ist.
Es wurde nun gefunden, daß die Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10, soweit
bisher bekannt, alle Eigenschaften der α -Sekretase aufweist, wodurch es nun
30 möglich ist, Zellen herzustellen, die α -Sekretase zusammen mit APP in großen
Mengen exprimieren.

20 Die erfindungsgemäßen Zellen sind vorzugsweise Säugerzellen, die mit Vektoren,
die Nukleinsäuresequenzen enthalten, die für das Substratprotein und für das
Proteaseprotein codieren, auf bekannte Weise stabil oder transient transfiziert
35 wurden (bezüglich Transfektion siehe Sambrook et al., Molecular Cloning, Cold
Spring Harbor Laboratory Press, 1989, New York, USA). Es kann wahlweise ein
40 einziger Vektor verwandt werden, der die Expression zweier Proteine ermöglicht
(z.B. pIRESneo, Clontech, Palo Alto, California, USA) oder ein Gemisch aus
zwei Vektoren, von denen jeder die Expression eines Proteintyps bewirkt. Altern-
45 ativ können die Nukleinsäuren, die für das Substratprotein bzw. für das Protea-
seprotein codieren, jeweils getrennt voneinander stabil oder transient transfiziert
30 werden. Außerdem kommen virale Expressionssysteme, z.B. solche die auf SV40-
Viren basieren, in Frage.

50

55

5 Ein anderes geeignetes Expressionssystem stellt die Injektion eines RNA-
Gemisches in *Xenopus* Oocyten dar. In diesem Fall wird DNA, die für das erste
bzw. zweite Protein codiert, in geeignete Vektoren kloniert, *in vitro*-transkribiert
10 und als Transkriptgemisch in *Xenopus* Oocyten injiziert. In diesem Fall handelt es
sich bei dem Begriff „rekombinante Nukleinsäure“ um heterologe RNA. Der Be-
griff „heterologe RNA“ bedeutet im Rahmen der Erfindung, daß die RNA sich
15 von der endogenen RNA unterscheidet, da sie aus einem anderen Organismus
stammt. Üblich ist es, in *Xenopus* Oocyten RNA zu injizieren, die aus Säugerzel-
len stammt, also heterolog in bezug auf *Xenopus* ist.

10 Auch Pflanzenzellen sind schon erfolgreich als Wirtszellsystem eingesetzt worden
(Lüning und Witzman (1995) FEBS. Lett. 361 (1), Seiten 65 bis 69). Ferner kann
es sich bei der Zelle auch um eine Hefe, eine Insektenzelle oder um eine Bakteri-
enzelle handeln.

15 Die erfindungsgemäßen Zellen, weisen den Vorteil auf, daß die α -Sekretase in
solch gleichbleibend hoher Konzentration gebildet werden kann, daß der Nach-
weis des Proteolyseproduktes in reproduzierbarer und einfacher Weise erfolgen
30 kann.

20 Dieser Vorteil wird dadurch bewirkt, daß durch entsprechende Wahl der rekombi-
nanten Nukleinsäure(n) die Menge an Transkripten, die für das Proteaseprotein
codieren, gesteuert werden kann. In der erfindungsgemäßen Zellen wird das Pro-
teaseprotein also unter Zuhilfenahme rekombinater Methoden erzeugt.

35 Damit die Funktion der Protease verfolgt werden kann, müssen die erfindungsge-
mäßten Zellen ein Substratprotein exprimieren. Dies kann endogen erfolgen, das
heißt der verwendete Zelltyp stellt natürlicherweise das Substratprotein über eine
ausreichende Zeitspanne im Lebenslauf einer Zelle her, die die Beobachtung der
40 Funktion der Protease zuläßt. Hierbei ist zu beachten, daß das Substratprotein von
praktisch jeder Säugerzelle gebildet zu werden scheint. Insbesondere exprimieren
45 auch Zellen aus Zelllinien wie HEK 293 ein Substratprotein (siehe Beispiel 8).

5 Auf besonders effektive Weise wird das Substratprotein durch rekombinante Methoden bereitgestellt. Hierdurch kann Substratprotein in weit größerer Menge
10 produziert werden als dem endogenen Proteinspiegel entspricht (siehe Beispiel 11).

5 Es werden in der Regel Expressionsvektoren eingesetzt, die besonders starke Promotoren wie den Cytomegalie-Viruspromotor (CMV-Promotor) oder einen
15 induzierbaren Promotor wie den MMTV-LTR-Promotor (Lee et al. (1981) Nature 294, Seite 228) besitzen. Diese Promotoren bewirken eine reproduzierbare und
20 vergleichsweise starke Transkription der Gene, die für das Substratprotein bzw. das Proteaseprotein codieren.

25 Erfindungsgemäß ist es erforderlich, daß die rekombinante Zelle rekombinante Nukleinsäure(n) enthält, die mindestens ein für ein Proteaseprotein codierendes
15 Gen aufweisen. Das Gen oder die Gene sind unter der Kontrolle eines heterologen Promotors, das heißt unter der Kontrolle eines Promotors, der die betreffenden
30 Gene in ihrer natürlichen genetischen Umgebung nicht kontrolliert (Fremd-Promotor).

20 Vorzugsweise weisen die rekombinanten Nukleinsäure(n) zusätzlich ein Gen auf, das für ein Substratprotein codiert.

35 Umfaßt die rekombinante Nukleinsäure(n) Gene, die für ein Substratprotein und ein Proteaseprotein codieren, so stehen mindestens das für ein Proteaseprotein codierende Gen, vorzugsweise aber beide Gene, d.h. das Gen für das Substrat-
40 25 protein und das Gen für das Proteaseprotein, unter der Kontrolle eines heterologen Promotors.

45 Der Begriff Gen bezeichnet im Rahmen der Erfindung einen DNA-Abschnitt aus dem Genom einer Zelle, der für ein bestimmtes Protein oder Polypeptid codiert.

30 Dieser Begriff erstreckt sich im Rahmen der Erfindung und abweichend vom normalen Sprachgebrauch auch auf die korrespondierende cDNA des Genomab-

5 schnitts. Die korrespondierende cDNA kann auf eine mRNA zurückgehen, die vollständig oder unvollständig gespleißt ist.

10 Andererseits kann durch die erwähnte Injektion *in vitro* transkribierter heterologer RNA in *Xenopus* Oocyten der Transkript-Spiegel direkt kontrolliert werden.
5 Durch Steuerung des Transkriptspiegels gelingt eine Steuerung der Translation, also letztlich eine Steuerung der Menge an Genprodukt in der Zelle.

Bei dem Substratprotein handelt es sich entweder um das humane Amyloidvorläuferprotein (APP, amyloid precursor protein, Schilling et al. (1991) Gene 98, Seiten 225 bis 230, GenBank/EMBL-Datenbank-Zugangsnummer X06989, Y00297) oder um ein homologes Protein aus einem anderen Organismus, das über mindestens 770 Aminosäuren mit dem humanen Gegenpart einer Sequenzidentität von 86 % auf Aminosäureebene aufweist. Das Protein kann auch jeweils nur einen
10 Teil des APPs umfassen, der mindestens die putative α -Sekretasespaltstelle, bestimmt durch Esch et al. (1990) Science 248, Seiten 1122 bis 1124, umfaßt sowie die Bereiche des APP, die an der Erkennung der Spaltstelle durch die α -Sekretase beteiligt sind (siehe z.B. Sisodia (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, Seiten 6075 bis 6079). Das Wort Spaltstelle oder Schnittstelle bezeichnet den zwischen
15 zwei Aminosäuren einer Proteinsequenz gelegenen Ort, an dem durch die Spaltung neue Termini entstehen. Durch Erzeugung von APP-Deletionsmutanten läßt sich auf einer dem Fachmann bekannten Weise die Erkennungsregion auf dem APP identifizieren. Das Substratprotein umfaßt somit in der Regel einen Sequenzbereich des APP oder eines Homologen, der die α -Sekretaseschnittstelle sowie die
20 α -Sekretaseerkennungsregion beinhaltet. Hierbei wird ein Sequenzbereich von 6 Aminosäureresten, insbesondere von 36 Aminosäureresten aminoterminal und von 12 Aminosäureresten, insbesondere 83 Aminosäureresten carboxyterminal bezogen auf die α -Sekretaseschnittstelle bevorzugt. Im Prinzip sind aber alle Proteine geeignet, die den Sequenzbereich aufweisen, der an der Erkennung der
25 Spaltstelle durch die α -Sekretase beteiligt ist.

5 Das Proteaseprotein umfaßt mindestens den für die proteolytische Aktivität notwendigen Sequenzbereich der Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 aus dem Rind (*Bos taurus*) oder aus dem Menschen oder eines homologen Proteins. Alternativ kann das Proteaseprotein auch durch Mutation (Insertion, Deletion oder 10 Austausch von Aminosäuren) aus einer Säugetier Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 hervorgehen (Mutein bedeutet mutiertes Protein), solange die enzymatischen Eigenschaften im wesentlichen erhalten bleiben, das heißt denen des Wildtyps im wesentlichen entsprechen. Die Disintegrin-Metalloproteasen ADAM 15 10 aus Mensch und Rind sowie aus Maus und Ratte sind bevorzugt. Daneben fallen auch homologe Proteine unter die Definition des Proteaseproteins, die über 824 Aminosäuren mit der Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 aus dem Rind oder dem Menschen eine Sequenzidentität von 21 %, bevorzugt von 41 %, insbesondere von 61 %, vor allem von 81 %, am stärksten bevorzugt von 94 % auf 20 Aminosäureebene aufweisen. Bevorzugt umfaßt das Proteaseprotein den Sequenzbereich von 213 bis 455, insbesondere von 213 bis 748, vor allem von 1 bis 748 bezogen auf die Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 des Rinds in der maximal langen Form (*full length*) bzw. den Sequenzbereich von 213 bis 455, insbesondere von 213 bis 748 vor allem von 1 bis 748 bezogen auf die Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 des Menschen in der maximal langen Form (*full length*). 25

35 Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Auffindung pharmazeutischer Wirksubstanzen.

Das erfindungsgemäße Verfahren ist gekennzeichnet durch die folgenden Schritte:

- 40 25 a) Bereitstellung eines oben beschriebenen Substratproteins,
b) Bereitstellung eines oben beschriebenen Proteaseproteins,
c) Applikation einer Testsubstanz auf eine Zelle, auf eine Zellfraktion oder auf ein Gemisch von Zellfraktionen, die jeweils sowohl das Substratprotein als auch das Proteaseprotein umfassen, und 45
30 d) Quantitative Bestimmung eines seit der Applikation der Testsubstanz gebildeten Proteolyseproduktes des Substratproteins.

5 Durch das erfindungsgemäße Verfahren ist es möglich, auf einfache und reproduzierbare Weise den Effekt von pharmazeutischen Wirksubstanzen auf die α -Sekretaseaktivität zu testen und auf diese Weise nach pharmazeutischen Wirksubstanzen mit vorteilhaften Wirkungen zu suchen. Zu den vorteilhaften Wirkungen, 10 die bei der Behandlung von neurodegenerativen Erkrankungen, insbesondere *Morbus Alzheimer* von Interesse sein könnte, gehört insbesondere die Stimulation der α -Sekretaseaktivität der Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist somit die Verwendung von Substanzen, die die von der Zelle gebildete Proteinmenge oder die enzymatische Aktivität 15 eines Proteaseproteins beeinflussen, zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung neurodegenerativer Erkrankungen, insbesondere von *Morbus Alzheimer*.

25 Die Bereitstellung eines Substratproteins und eines Proteaseproteins wird in der Regel durch zeitgleiche Coexpression beider Proteine in den geeigneten Wirtszellsystemen auf bekannte Art und Weise bewerkstelligt. Gegebenenfalls ist die Induktion der Expression notwendig (bei induzierbaren Promotoren wie MMTV-LTR). Wurden Zellen transient transfiziert oder RNA injiziert, so werden die Zellen zum Zeitpunkt der höchsten Expressionsdichte entnommen.

30 Das Verfahren kann mit intakten Zellen durchgeführt werden. In diesem Falle wird die Testsubstanz dem Kulturmedium zugegeben und die seit der Zugabe der Testsubstanz gebildete Menge an Proteolyseprodukt des Substratproteins im Zellüberstand bestimmt. Alternativ können die Zellen aufgebrochen werden, wobei 35 die Testsubstanz einer Zellfraktion oder einer Mischung aus Zellfraktionen zugesetzt wird, die sowohl das Substratprotein als auch das Proteaseprotein umfaßt. Sollen Zellfraktionen eingesetzt werden, so ist es theoretisch auch möglich, Substratprotein und Proteaseprotein getrennt in zwei Zelllinien zu exprimieren, die Zellen aufzubrechen und die Membranfraktionen zu vereinigen. Bei Einsatz von 40 Zellfraktionen erfolgt die quantitative Bestimmung des seit der Applikation der Testsubstanz gebildeten Proteolyseproduktes nach Zentrifugation der Probe im 45 Membranüberstand.

5 Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung eines erfindungsgemäßen Proteaseproteins zur proteolytischen Spaltung eines erfindungsgemäßen Substratproteins.

10 Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist eine rekombinante Zelle enthaltend eine rekombinante Nukleinsäure(n), die codieren:

15 a) für eine dominant negative Form der Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 aus dem Rind (*Bos taurus*), aus dem Menschen oder aus einem anderen Säugetier und

20 b) gegebenenfalls für ein Substratprotein.

25 Dominant negative Formen der Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 können durch Punktmutation in einem besonders konservierten Bereich, insbesondere im aktiven Zentrum des Enzymes, erhalten werden. Ein Beispiel für eine dominant negative Form der Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 ist die Mutante E384A
30 der Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 des Rindes, die in den Beispielen beschrieben und hier besonders bevorzugt ist. Entsprechende Mutanten aus Mensch oder einem anderen Säugetier sind ebenfalls bevorzugt. Die rekombinanten Zellen weisen den Vorteil auf, daß durch die Expression der dominant negativen Form die endogene α -Sekretaseaktivität fast vollständig ausgeschaltet, was sich in einer
35 verminderten proteolytischen Spaltung des ebenfalls exprimierten Amyloidvorläuferproteins äußert. Dies erleichtert die Suche nach neuen Sekretasen.

40 Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Auffindung weiterer Sekretasen oder pharmazeutischer Wirksubstanzen, umfassend die folgenden Schritte

45 a) Expression eines Substratproteins und einer dominant negativen Form der Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 aus dem Rind (*Bos taurus*), aus dem Menschen oder aus einem anderen Säugetier in einer oben beschriebenen Zelle.

b) Expression eines weiteren Testproteins in der Zelle und/oder Applikation einer Testsubstanz auf die Zelle oder auf eine Zellfraktion dieser Zelle, und

c) Quantitative Bestimmung eines gebildeten Proteolyseproduktes des Substratproteins.

Dies Verfahren beruht auf der Erkenntnis, daß eine dominant negative Form der Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 die endogene α -Sekretaseaktivität einer Zelle, die dieses Protein exprimiert, unterdrückt. Erfindungsgemäß werden in diesem Verfahren nur Zellen oder Zellmembranen verwendet, die die dominant negative Form aufweisen.

Das Testprotein wird unter Anwendung der dem Fachmann bekannten Techniken in derselben Zelle exprimiert, die auch das Substratprotein und die dominant negative Form coexprimiert. Bei dem Verfahren wird geprüft, ob die Expression des Testproteins die Menge pro Zeiteinheit gebildeten Proteolyseprodukt des Substratproteins erhöht. Ist dies der Fall, so ist dies ein starker Hinweis darauf, daß es sich bei dem Testprotein um eine Sekretase handelt, die sich von der α -Sekretase bzw. von der Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 unterscheidet. Durch Versuche mit künstlichen Peptiden (etwa gemäß Fig. 3) läßt sich klären, ob das Testprotein selber eine Protease/Sekretase ist oder die Aktivität einer Protease nur beeinflußt. Ferner kann eine Testsubstanz auf die Zelle oder auf eine Zellfraktion dieser Zelle gegeben werden, um festzustellen, ob die Testsubstanz die Aktivität der Sekretase, die keine α -Sekretase bzw. nicht die Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 ist, beeinflußt.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung einer dominant negativen Form der Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 aus dem Rind (*Bos taurus*), aus dem Menschen oder aus einem anderen Säugetier oder einer Nukleinsäure, codierend für eine dieser dominant negativen Formen, zur Unterdrückung der α -Sekretaseaktivität einer Zelle.

Bei einer bevorzugten Form einer erfindungsgemäßen Zelle codiert eine rekombinante Nukleinsäure ein Substratprotein, das ein Fusionsprotein aus einem Marker-

5 protein oder einem Enzym und dem Amyloidvorläuferprotein darstellt. Der aminotermi-
nale Sequenzbereich des Fusionsproteins wird von dem Markerprotein
10 (wie GFP, *Green fluorescent Protein*), einem Enzym oder dem katalytisch wirk-
samen Teil eines Enzyms und der carboxyterminale Sequenzbereich vom Amy-
5 loidvorläuferprotein oder einem Teil des Amyloidvorläuferproteins gebildet.

15 Bei einer bevorzugten Form der erfindungsgemäßen Zelle handelt es sich bei dem
Enzym um die alkalische Phosphatase SEAPs, der gegenüber der Wildtyp-
Variante SEAP die 24 carboxyterminalen Aminosäuren fehlen (SEAP : Soluble
10 Human Secreted Alkaline Phosphatase). Diese SEAP-Variante ist verkürzt, um
20 die Anheftung des Enzyms über GPI-Kopplung zu verhindern. Nukleinsäure, die
für SEAP codiert, ist kommerziell erhältlich (pSEAP, Tropix Corp., Belford,
Massachusetts, USA, Genbank-Zugangsnummer U09660).

25 Bei einer bevorzugten Form der erfindungsgemäßen Zelle codiert einer rekombi-
nante Nukleinsäure für ein Substratprotein, das eine Sequenz gemäß SEQ ID-
No.:1 aufweist. Dieses Protein stellt ein Fusionsprotein aus SEAPs und den 119
30 carboxyterminalen Aminosäuren des humanen Amyloidvorläuferproteins
(APP₁₁₉) dar. Dieses Protein wird z.B. von einer Nukleinsäure gemäß SEQ ID-
20 No.:2 codiert. Diese Nukleinsäure kann Bestandteil eines Expressionsvektors sein
z.B. gemäß Vektor 136.1 (pcDNA3-SEAPs/APP₁₁₉, siehe Fig. 1) oder gemäß
35 Vektor 137.11 (pcDNA3-SEAPs/APP₁₁₉_ADAM10-HA, siehe Fig. 2).

40 Bei einer bevorzugten Ausführungsform eines der erfindungsgemäßen Verfahren
25 erfolgt die quantitative Bestimmung des Proteolyseproduktes durch einen enzy-
matischen Test, bei dem von der katalytischen Aktivität der Probe auf die Menge
an Proteolyseprodukt geschlossen wird. Dies Verfahren kann z.B. unter Verwen-
45 dung von erfindungsgemäßen Zellen durchgeführt werden, die ein Substratprotein
gemäß SEQ ID-No.:1 exprimieren. Durch die α -Sekretaseaktivität der Disinte-
30 grin-Metalloprotease ADAM 10 wird der aminoterminele Teil des Substratpro-
teins abgespalten. Da dieses Proteolyseprodukt alkalische Phosphataseaktivität
50 hat, läßt es sich im Zell- oder Membranüberstand z.B. durch Chemilumineszenz

5 nachweisen. Hierbei können handelsübliche Testsysteme wie Phospha-Light[™] von Tropix Corp. (Belford, Massachusetts, USA) verwandt werden.

10 Die Abtrennung des Zellüberstands oder des Zellmembranüberstands nach Applikation der pharmazeutischen Wirksubstanz hat so zu erfolgen, daß sich die spezifische enzymatische Aktivität des Proteolyseproduktes durch den Abtrennvorgang
5 nicht ändert oder sich in reproduzierbarer Weise ändert, so daß Proteolyseproduktmenge und katalytische Aktivität korreliert werden kann.

Bei einer weiteren bevorzugten Ausführungsform eines der erfindungsgemäßen
20 Verfahren erfolgt die quantitative Bestimmung des Proteolyseproduktes durch einen spektroskopischen Test (wie Fluorometrie), bei dem von der spektroskopischen Eigenschaft einer Probe (wie Fluoreszenz) auf die Menge an einem bestimmten Proteolyseprodukt in der Probe geschlossen wird. Diese Ausführungsform bietet sich an, wenn das Substratprotein ein Fusionsprotein aus einem fluo-
25 reszierenden Protein (wie GFP) und dem Amyloidvorläuferprotein darstellt.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung sind Verfahrenen zur Bestimmung des
30 Risikofaktors für neurodegenerativen Erkrankungen, insbesondere für *Mobus Alzheimer*. Bei diesem Verfahren wird eine DNA-Probe der Testperson unter Einsatz
20 genspezifischer Primer gegen die humane Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 der Polymerasekettenreaktionsanalyse (PCR-Analyse, PCR-Reaktion) unterworfen, das Amplifikationsprodukt ggf. sequenziert und die Sequenz des Amplifikationsproduktes mit der bekannten Sequenz der humanen Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 verglichen. Die Anzahl und Position der Sequenzun-
35 terschiede, die sich in einer anderen Aminosäureabfolge äußert, läßt Rückschlüsse auf den Risikofaktor für neurodegenerativen Erkrankungen, insbesondere für *Mobus Alzheimer* zu. Hierbei wird angenommen, daß Sequenzunterschiede, die zu einer Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10-Variante mit beeinträchtigter α -Sekretaseaktivität führen, eine Prädisposition für neurodegenerativen Erkrankungen, insbesondere für *Morbus Alzheimer* zur Folge haben. Ferner kann das Amplifikationsprodukt einer Schmelzpunktanalyse unterzogen und auch auf diese
40 Weise mit der bekannten Sequenz verglichen werden. Für diesen Zweck werden

5 Temperaturgradienten-Gelelektrophorese und Fluoreszenzspektroskopische Methoden eingesetzt (z.B. TGGE-System der Fa. Biometra, LightCycler™ der Fa. Hoffmann-LaRoche). Darauf aufbauend können spezifische Gensonden gegen
10 humanes ADAM 10 oder dessen mutierte Varianten für diagnostische Zwecke eingesetzt werden (z.B. im Rahmen der FISH-Technik (*fluorescent in situ hybridisation*) oder mit Hilfe von DNA-Chips). Als Gensonden kommen Nukleinsäure- oder Peptid-Nukleinsäureoligomere in Betracht.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist somit ein Verfahren zur Bestimmung des Risikofaktors für neurodegenerative Erkrankungen, insbesondere für *Morbus*

10 *Alzheimer*, wobei

a) eine DNA-Probe der Testperson unter Einsatz genspezifischer Primer gegen die humane Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 der PCR-Analyse unterworfen wird,

25 b) und die Sequenz des Amplifikationsproduktes mit der bekannten Sequenz der humanen Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 verglichen wird.

30 Mit Hilfe von Gensonden wurde der chromosomale Lokus von humanem ADAM 10 auf Chromosom 15 bei 12.44 cR3000 zugeordnet (Yamazaki et al. (1997) Genomics 45, Seiten 457-459). Durch chromosomale Translokation oder auch durch
35 Alleldeletion in Chromosomen (Bsp. Tumorsuppressor p53) kann es zu einem Aktivitätsverlust von Genprodukten kommen. Es ist daher nicht auszuschließen, daß neurodegenerative Erkrankungen, insbesondere *Morbus Alzheimer* durch einen Aktivitätsverlust der ADAM 10-Protease bedingt wird, welcher aus einer chromosomalen Veränderung resultiert. Durch Verwendung von ADAM 10-
40 Gensonden ließe sich ein Fehlen oder eine falsche Lokalisierung des ADAM 10-Gens bestimmen und als diagnostischer Parameter einer Prädisposition für neurodegenerativen Erkrankungen, insbesondere für *Morbus Alzheimer* nutzen.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist somit ein Verfahren zur Bestimmung des Risikofaktors für neurodegenerative Erkrankungen, insbesondere für *Morbus*
30 *Alzheimer*, wobei die tatsächliche chromosomale Lokalisierung des Gens der

Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 mit seiner normalen chromosomalen Lokalisierung, Chromosom 15 bei 12.44 cR₃₀₀₀, verglichen wird.

Eine Verringerung der Aktivität der ADAM 10-Protease kann darüber hinaus durch eine verminderte Transkription des ADAM 10-Gens bedingt werden. Die Effizienz der Transkription des ADAM 10-Gens läßt sich durch die Quantifizierung der ADAM 10-mRNA ermitteln und als Parameter bei der Diagnose von neurodegenerativen Erkrankungen, insbesondere von *Morbus Alzheimer* oder auch zur Diagnose einer Prädisposition dieser Krankheiten nutzen. Dazu muß die ADAM 10-mRNA aus Zell- oder Gewebeproben isoliert und quantifiziert werden. Zur direkten Quantifizierung der mRNA bietet sich die sogenannte Northern-Blot-Analyse an. Eine z.B. radioaktiv markierte, zur ADAM 10-mRNA komplementäre Nukleinsäuresonde hybridisiert dabei mit der ADAM 10-mRNA. Die Menge an spezifisch gebundener Sonde wird anschließend, nach den dem Fachmann bekannten Methoden, quantifiziert. Die ADAM 10-mRNA kann nach bekannten Methoden zunächst in einzelsträngige, komplementäre DNA und dann in doppelsträngige komplementäre DNA (cDNA) umgewandelt werden. Sowohl die einzelsträngige als auch die doppelsträngige DNA läßt sich durch dem Fachmann bekannte Methoden, wie z.B. Echtzeit-PCR, DNA-Mikro-Array-Analyse, DNA Chiptechnologie etc., quantifizieren.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist somit ein Verfahren zur Bestimmung des Risikofaktors für neurodegenerative Erkrankungen, insbesondere für *Morbus Alzheimer*, durch quantitative Bestimmung der mRNA-Mengen von humanem ADAM 10 aus Zell- und Gewebeproben, umfassend einen der folgenden Schritte:

- a) Isolierung und Quantifizierung der ADAM 10-mRNA,
- b) Einzel- oder doppelsträngige cDNA die ADAM 10-mRNA umgeschrieben wird welche dann quantifiziert wird,
- c) die ganze Nukleotidsequenz von ADAM 10 oder Teile davon zur Quantifizierung mittels Hochdurchsatz-Expressionsanalyse (z.B. DNA-Chip-Technologie u. DNA-Micro-Array) eingesetzt wird.

Die α -Sekretaseaktivität von ADAM 10 läßt sich durch Aktivatoren der Proteinkinase C stimulieren. ADAM 10 besitzt in seinem Carboxylterminus einen Threoninrest in Aminosäureposition 719 (T719), welcher eine Proteinkinase C-Phosphorylierungsstelle darstellt. Es ist naheliegend, daß die Aktivität von ADAM 10 durch Phosphorylierung an Threonin 719 gesteigert wird. Für den Aktivitätsverlust von ADAM 10 könnte daher eine fehlende, oder zumindest eine verminderte, Phosphorylierung von ADAM 10 verantwortlich sein. Methoden, mit denen der Phosphorylierungsgrad von ADAM 10 bestimmt werden kann, können daher zur Diagnose von neurodegenerativen Erkrankungen, insbesondere von *Morbus Alzheimer* und zur Diagnose einer Prädisposition dieser Krankheiten angewendet werden. Die Quantifizierung des Phosphorylierungsgrades von ADAM 10 kann an Zell- oder Gewebeproben durchgeführt werden oder auch an aus diesen Proben isoliertem ADAM 10 erfolgen. Durch zweidimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophorese und anschließenden Elektrottransfer kann ADAM 10, getrennt von anderen Proteinen einer Zell- oder Gewebeprobe, auf proteinbindenden Membranen dargestellt werden. Die Phosphorylierung von ADAM 10 läßt sich anschließend, gegebenenfalls nach Tryptischem-Verdau, durch Massenspektrometrie, durch Anti-Phosphothreonin-Antikörper oder durch noch zu entwickelnde Anti-Phospho-ADAM 10-Antikörper quantifizieren. Mit den gleichen Methoden läßt sich auch der Phosphorylierungsgrad von gereinigtem ADAM 10 ermitteln. Es können auch Experimente herangezogen werden, mit denen man die Menge an Phosphothreonin bestimmt, bzw. bei denen man eine Dephosphorylierung von Phospho-ADAM 10 nach bekannten Methoden quantitativ durchführt (Ausubel et al. (Hrsg.) (1995) Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York).

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist somit Verfahren zur Bestimmung des Aktivitätszustands von humanem ADAM 10 durch Quantifizierung des Phosphorylierungsgrades von humanem ADAM 10 in Zell- und Gewebeproben, wobei entweder

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55

a) ADAM 10 isoliert wird und sein Phosphorylierungsgrad entweder durch Massenspektrometrie, durch spezifische Anti-Phosphothreonin-Antikörper, durch Quantifizierung der Aminosäure Phosphothreonin oder durch Dephosphorylierung (Phosphatase-Assay) von ADAM 10 bestimmt wird, oder

b) Zell- oder Gewebeproben direkt in eine Proteomanalyse eingesetzt werden und der Nachweis von phosphoryliertem ADAM 10 wie unter Punkt a) beschrieben erfolgt.

10 Zum generellen Nachweis und zur Quantifizierung von ADAM 10 in Zell- und Gewebeproben bieten sich darüber hinaus spezifische, ADAM 10 erkennende Antikörper und Antikörperderivate an. Unter Antikörperderivaten werden hier rekombinante Einzelketten-Antikörper und auch rekombinante Phagen verstanden, die rekombinante Einzelketten-Antikörper enthalten. Spezifisch ADAM 10
15 erkennende Antikörper können daher zur Diagnose von neurodegenerativen Erkrankungen, insbesondere von *Morbus Alzheimer* und zur Feststellung einer Prädisposition für neurodegenerativen Erkrankungen, insbesondere für *Morbus Alzheimer* verwendet werden.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung sind somit Antikörper oder Antikörperderivate, die ein Proteaseprotein spezifisch binden

Folgende transgene nicht-menschliche Tiere sind weitere erfindungsgemäße Gegenstände.

- 20
25
30
35
40
45
50
55
- a) Transgenes nicht-menschliches Tier, das rekombinante Nukleinsäure, codierend für ein Proteaseprotein oder für eine dominant negative Form der Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 aus dem Rind (*Bos taurus*), aus dem Menschen oder aus einem anderen Säugetier aufweist.
- b) Transgenes nicht-menschliches Tier, aufweisend eine zu einer Nukleinsäure, die für ADAM 10 eines Säugetiers codiert, mindestens über einen Abschnitt von 10 Basen komplementäre rekombinante Nukleinsäure.

Transgene Tiere können im Rahmen der Erfindung homozygot oder heterozygot in bezug auf das Gen sein, das dem Tier die transgene Eigenschaft verleiht. Außerdem sind von dem Begriff „transgenes Tier“ Menschen nicht umfaßt.

Transgene Tiere werden auf an sich bekannte Weise erzeugt. Hierbei wird bei einer Ausführungsform von Tier a) rekombinante Nukleinsäure verwendet, z.B. in Form eines Vektors, die für ein Proteaseprotein codiert. Bei einer anderen wird rekombinante Nukleinsäure verwendet, z.B. in Form eines Vektors, die für eine dominant negative Form der Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 aus dem Rind (*Bos taurus*), aus dem Menschen oder aus einem anderen Säugetier codiert.

Bei Tier b) wird eine sogenannte *antisense*-Nukleinsäure verwendet, die über einen Bereich von mindestens 10 Basen (vorzugweise 15, insbesondere 20 oder 30 Basen) einer Nukleinsäure, die für ADAM 10 eines Säugetiers (auch eines Menschen) codiert, komplementär ist, d.h. an die Nukleinsäure binden kann.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung der Tiere a) und b) als Tiermodelle für die Suche und die Erprobung von pharmakologischen Wirkstoffen gegen neurodegenerativen Erkrankungen, speziell gegen *Morbus Alzheimer*. Weiterhin können physiologische Veränderungen oder Verhaltenseigenarten der Tiere Ausschluß darüber geben, welche Prozesse oder Entwicklungsstadien eines Organismus durch ADAM 10 beeinflußt werden.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung einer rekombinanten Nukleinsäure, codierend für ein Proteaseprotein oder für eine dominant negative Form der Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 aus dem Rind (*Bos taurus*), aus dem Menschen oder aus einem anderen Säugetier zur Erzeugung transgener Zellen und transgener nicht-menschlicher Tiere und zur Gentherapie.

Die Verwendung einer Nukleinsäure, die für die Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 des Menschen codiert, ist bevorzugt. Bei der Konstruktion des Vektors für die Gentherapie wird die Nukleinsäure gegebenenfalls über eine Mehrfachschnittstelle (*multiple cloning site*) in den Vektor so eingebaut, daß in einer Zelle,

5 die mit dem so konstruierten Vektor transfiziert ist, Expression der rekombinanten
Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 feststellbar ist. Durch das Einschleusen
10 von Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 oder eines katalytisch aktiven Teils
derselben in die Zielzellen im Rahmen der Gentherapie können α -
5 Sekretaseaktivitätsdefekte von Zellen kompensiert werden. Dadurch können die
Symptome von *Morbus Alzheimer* und anderer neurodegenerativer Erkrankungen
15 zurückgedrängt werden.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung einer zu einer Nu-
10 kleinsäure, die für ADAM 10 eines Säugetiers codiert, mindestens über einen Ab-
schnitt von 10 Basen (vorzugeweise 15, insbesondere 20 oder 30 Basen) kom-
plementäre rekombinante Nukleinsäure zur Erzeugung von transgenen Zellen und
transgenen nichtmenschlichen Tieren und zur Gentherapie.

15 Ebenfalls zur Erfindung gehört also auch die Erzeugung von transgenen Tieren,
bei denen eine ADAM 10-Protease, eine dominant negativ wirkende Mutante der-
selben, oder eine zur ADAM 10-DNA-Sequenz entgegengesetzt komplementäre
30 (revers komplementäre) Nukleinsäure zusätzlich exprimiert bzw. transkribiert
wird. Die zu transkribierende Nukleotidsequenz kann dabei unter Kontrolle eines
20 ubiquitär aktiven Promotors wie z.B. dem Cytomegalie-Viruspromotor (CMV-
Promotor) stehen. Mit diesem ist eine Expression in allen Geweben möglich. Al-
ternativ kann die zu transkribierende Nukleotidsequenz unter Kontrolle eines ge-
35 websspezifischen Promotors stehen. Von besonderem Interesse sind hier solche
Promotoren, die eine gehirnspezifische Expression erlauben, insbesondere solche,
40 die für Neuronen und Gliazellen spezifisch sind. Unter Verwendung des Promo-
tors des Thy1-Glykoproteins der Maus gelang es beispielsweise, das humane
Amyloid-Vorläuferprotein in Neuronen von Mäusen zu exprimieren (Moechars et
45 al. (1999) J. Biol. Chem. 274, Seiten 6483-6492). In Analogie hierzu könnte eine
ADAM 10-Protease, deren dominant negative Form oder eine entgegengesetzt
50 komplementäre Form in Neuronen von Mäusen entweder alleine oder zusammen
mit Varianten des humanen Amyloid-Vorläuferproteins exprimiert werden. Sol-

5 che transgenen Tiere können als Modellsysteme zum Testen und Auffinden von
Pharmaka und zur Untersuchung der Amyloidprozessierung verwendet werden.
10 Die Überexpression einer proteolytisch aktiven ADAM 10-Protease sollte dabei
die Entstehung von Amyloid- β -Peptiden verhindern bzw. zumindest verlangsamen.
5 Die Expression einer dominant negativ wirkenden ADAM 10-Mutante sollte
die Aktivität der endogenen ADAM 10-Protease hemmen und damit zu einer
15 vermehrten Entstehung von Amyloid- β -Peptiden beitragen. Eine zweite Strategie
zur Ausschaltung der endogenen ADAM 10-Protease stellt die Transkription einer
zur ADAM 10-cDNA entgegengesetzt komplementären DNA dar. Mit dieser so-
20 genannten *antisense*-Strategie ist es möglich, die Expression eines endogenen
Proteins in Zellkultur zu unterdrücken (siehe z.B. Volonte et al. (1999) FEBS
Lett. 445, Seiten 431-438). Das Ausschalten von Genen ist mit einem solchen
Ansatz auch in vivo möglich (siehe z.B. Hayashi et al. (1996) Gene Therapie 3,
25 Seiten 878-885).

15 Ein weiter Gegenstand der Erfindung ist ein Arzneimittel, das eine rekombinante
30 Nukleinsäure enthält, die für ein erfindungsgemäßes Proteaseprotein codiert.

Ein solches rekombinantes Arzneimittel ist z.B. ein Virus oder ein Vektor für die
Gentherapie, der Nukleinsäure, die für ein erfindungsgemäßes Proteaseprotein
20 codiert, aufweist.

Als Arzneimittel kann weiterhin ein katalytisch aktiver, löslicher Proteinanteil von
ADAM 10 dienen. Dieses Polypeptid wird nach den dem Fachmann bekannten
40 Methoden rekombinant z.B. in Bakterien, Insektenzellen, Hefen oder eukaryonti-
schen Säugerzellen hergestellt und in reiner Form isoliert. Die Applizierung die-
25 ses ADAM 10-Polypeptids erfolgt bevorzugt durch Injektion oder durch Resorp-
tion.
45

30 Die Erfindung wird durch die nachfolgende Zeichnung näher erläutert.

5

Es zeigt

10

Fig. 1 den Expressionsvektor 136.1, der für ein Substratprotein codiert, das ein Fusionsprotein aus SEAPs und APP₁₁₉ darstellt.

5

15

Fig. 2 den Expressionsvektor 137.11, der außer für das vorgenannte Fusionsprotein für ein Proteaseprotein codiert, welches aus einer markierten Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 besteht.

20

Fig. 3 die proteolytische Spaltung von Peptiden, die die α -Sekretaseschnittstelle von APP aus dem Rind umfassen, durch Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10.

25

Fig. 4 die Expression und Deglycosilierung der Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10.

30

Fig. 5 die Sekretion von APPs α von unveränderten HEK-Zellen (HEK 293, kurz HEK steht für *human embryonic kidney*) und von HEK-Zellen, die die Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 exprimieren (HEK-ADAM 10-Zellen).

35

Fig. 6 den Einfluß des Metalloprotease ADAM 10 auf die Entstehung der Proteolyseprodukte APPs α und p10.

40

Fig. 7 den inhibierenden Effekt der dominant negativen Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 (DN).

45

Fig. 1 zeigt den Vektor 136.1, der auf einem pcDNA3-Vektor (Invitrogen BV, Groningen, Niederlande) basiert und in den eine Nukleinsäure einkloniert wurde, die für ein Protein gemäß SEQ ID-No.:1 codiert. Zur Konstruktion der Nukleinsäure wurde der Bereich, der die ersten 506 aminoterminalen Aminosäuren von SEAP codiert, durch PCR amplifiziert (Produkt: SEAPs-DNA). Als Matrize wur-

50

55

de der Vektor pSEAP (Tropix Corp., Belford, Massachusetts, USA) benutzt. Durch PCR wurde eine BsrGI-Restriktionsschnittstelle eingeführt. Die codierende Region für die letzten 119 carboxyterminalen Aminosäuren des menschlichen Amyloidvorläuferproteins wurden durch PCR auf der korrespondierenden cDNA amplifiziert (Produkt: APP₁₁₉-DNA). Durch PCR wurde eine BsrGI-Schnittstelle am 5'-Ende der cDNA eingeführt. Die BsrGI-Schnittstellen der SEAPs-DNA und APP₁₁₉-DNA wurden für die Konstruktion einer Nukleinsäure eingesetzt, die für das SEAPs/APP₁₁₉-Fusionsprotein gemäß SEQ ID-No.:1 codiert, eingesetzt.

Fig. 2 zeigt den Vektor 137.11, der Sequenzbereiche enthält, die für das vorgenannte Fusionsprotein und eine mit einem Marker (Influenza Hämagglutinin (HA) Epitop tag) markierte Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10-Variante codieren. 137.11 basiert auf dem Vektor pcDNA3 der Firma Invitrogen.

Fig. 3 zeigt die proteolytische Spaltung von Peptiden, die die Stelle der α -Sekretasespaltung von APP durch ADAM 10 umspannen.

(A) Ordinate: relative Absorption [220 nm], Absisse: Zeit [min]. Peptidsubstrate wurden in Spaltungspuffer in Abwesenheit (linker Graph) oder in Anwesenheit von ADAM 10 (rechter Graph) 6 Stunden bei 37°C inkubiert und anschließend der HPLC-Analyse unterzogen. Die Sterne kennzeichnen die Peptidsubstrate und die Zahlen, die generierten Produkte: 1 : EVHHQK-OH; 2 : LVFFAEDVGSNK-NH₂; 3 : LVFFGEDVGSNK-NH₂.

(B) CD-Spektren von APP-Peptiden. Ordinate: Elliptizität [θ] ($\text{deg} \times 10^{-3}$); Absisse: Wellenlänge [nm]. Die Peptide wurden in 20 mM Tris/HCl pH 8,3, 250 mM NaCl bei einer Endkonzentration von 0,5 mM gelöst. Die Messungen wurden in Gegenwart von 0,5 % Natriumdodecylsulfat (SDS) ausgeführt.

Fig. 4 zeigt die Expression und Deglycosilierung der Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10

(A) nach Transfektion von HEK-Zellen und HEK-APP₆₉₅-Zellen mit ADAM 10-cDNA wurden Zellysate mit monoklonalen Anti-HA-Antikörper immunoprecipitiert, der Deglycosilierung mit PNGase F (Spur 3) unterworfen oder

5 direkt durch ein 4-12 % NuPAGE-Gelsystem und Western Blot analysiert.
HEK-APP₆₉₅-Zellen sind HEK-Zellen, die ein humanes 695 Aminosäuren
10 großes Amyloidvorläuferprotein (GenBank/EBML-Datenbank-Zugangs-
nummer: Y00264) exprimieren. Immunoblots wurden mit dem ECL-
5 Detektionssystem (Pharmacia&Upjohn GmbH, Erlangen) durchgeführt.

(B) HEK und HEK-ADAM-10-Zellen wurden mit 0,3 mg/ml Sulfo-NHS-LC-
15 Biotin (Pierce, Rockford, Illinois, USA) in PBS 30 min bei 4°C inkubiert.
Nach Immunopräzipitation mit dem monoklonalen Anti-HA-Antikörper
(16B12) und Elution des Immunkomplexes wurden 4/5 des Eluats mit Strep-
20 tavidin (a), inkubiert, während das verbliebene Fünftel direkt einer 10 %-igen
SDS-PAGE unterworfen wurde (b) und anschließend auf PVDF-Membranen
geblottet wurde. Die Detektion wurde wie oben beschrieben durchgeführt.

25 Fig. 5 zeigt die Sekretion von APP_s von HEK- und HEK-ADAM-10-Zellen.

15 (A) Die Zellen wurden in Gegenwart der bezeichneten Verbindung inkubiert.
Nach 4 Stunden wurde das Medium gesammelt, die Proteine präzipitiert und
einer Immunoblotanalyse mit dem monoklonalen Antikörper 6E10, gefolgt
30 von einem sekundären [³⁵S]-markierten Anti-Maus-IgG-Antikörper, unterzo-
gen.

20 (B) Quantitative Analyse des sekretierten APP_s. Die APP_s entsprechenden
radioaktiven Banden wurden mit Hilfe eines Bio-Imaging Analyzer BAS-
35 1800 quantifiziert. Die Meßwerte wurden wie in dem Beispiel beschrieben,
auf verschiedene Proteinmengen normiert. Die Ergebnisse wurden als Pro-
zentwerte von sekretiertem APP_s in nicht-rekombinanten Vergleichs-HEK-
40 Zellen ausgedrückt und die Standardabweichungen aus mindestens drei un-
abhängigen Experimenten angegeben. Ordinate: Sekretion von APP_s [Pro-
zentwert der Wirkung in HEK-Zellen]. Abszisse: Probennummer, dieselbe
45 Numerierung wie in (A).

50 Fig. 6 zeigt den Einfluß der Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 auf die Ent-
stehung der Proteolyseprodukte APP_s und p10.

5 (A) HEK und HEK-ADAM-10-Zellen wurden mit 200 μ Ci/ml [35 S] L-Methionin
und Cystein fünf Stunden metabolisch markiert. Die Kulturmedien wurden
10 mit dem polyklonalen Antikörper 1736 immunoprecipitiert und einer 10 %-
igen SDS-PAGE unterzogen. Die Analyse wurde mit dem Bio-Imaging Ana-
5 lyzer BAS-1800 durchgeführt. APP₇₅₁ α bezeichnet das Proteolyseprodukt,
das durch α -Sekretase-Einwirkung auf eine APP-Variante, welche 751
15 Aminosäuren umfaßt, entsteht.

(B) Die Zellysate wurden mit dem Antikörper C 7 immunoprecipitiert. Die Pro-
ben wurden mit Hilfe eines 10 – 20 %-igen Tris-Tricine Gel (Novex) getrennt
10 und wie oben beschrieben analysiert.

(C) Quantitative Analyse von intaktem APP, das die ganze Länge aufweist (Holo-
APP), und p10. Die entsprechenden radioaktiven Banden wurden wie in Fig.
5 quantifiziert. Die Werte von p10 wurden auf die Holo-APP-Spiegel nor-
miert. Die Ergebnisse vier unabhängiger Experimente wurden mit den ent-
25 sprechenden Standardabweichungen angegeben. Die statistische Signifikanz
zwischen Vergleichszellen und HEK-ADAM-10-Zellen wurde mit Hilfe des
15 ungepaarten Student's *t*-Test bestimmt (*, $P < 0,005$).

Fig. 7 zeigt den inhibierenden Effekt der dominant negativen Mutante DN der
20 Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10.

35 (A) Endogene Expression der Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 in HEK-
Zellen. ADAM 10 mRNA von MDBK und HEK-Zellen wurde mit einem
Oligonucleotid, das spezifisch für die bovine und die humane ADAM 10
mRNA ist, revers transkribiert und anschließend amplifiziert, was Fragmente
40 mit 541 Basenpaaren ergab. Als Vergleich wurden HEK-Zellen, die vor dem
Reverse-Transkriptase-Schritt mit RNase A behandelt worden waren, einge-
setzt. Als Standard wurde der DNA-Molekulargewichtsmarker VI (St, siehe
Abbildung) von Boehringer Mannheim eingesetzt. Die Fragmente zwischen
45 1230 und 154 Basenpaaren sind gezeigt.

30 (B) HEK und HEK/DN-Zellen wurden in Abwesenheit und Anwesenheit von
1 μ M PMA inkubiert. HEK/DN-Zellen sind Zellen, die die dominant negati-
ven Mutante DN der Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 exprimieren.
50

Nach vier Stunden wurde das Medium gesammelt, die Proteine präzipitiert und einer Immunoblotanalyse, wie in Fig. 5 beschrieben, unterzogen.

(C) Quantitative Analyse des sekretierten APP α . Die radioaktiven Banden gehören zu APP α und wurden quantifiziert, wie in Fig. 5 beschrieben. Die Ergebnisse sind als Prozentwerte des sekretierten APP α in Vergleichs-HEK-Zellen ausgedrückt und als Mittelwerte von mindestens drei unabhängigen Experimenten angegeben. Die Fehlerbalken beziehen sich auf die Standardabweichungen. Die statistische Signifikanz zwischen Kontrollzellen und HEK/DN-Zellen, mit und ohne PMA-Behandlung, wurde durch den ungepaarten Student's *t*-Test bestimmt (*, $P < 0,005$; **, $P < 0,001$).

Ordinate: Sekretion von APP α [Prozentwert der Wirkung in HEK-Zellen].

Die Erfindung wird näher durch die nachfolgenden Beispiele beschrieben.

Materialien

Die Peptide wurden mit dem Festphasenverfahren unter Verwendung von Fmoc-Chemie auf dem 9050 + Millipor Peptidsynthesizer synthetisiert. BB-3103 wurde von der British Biotech zur Verfügung gestellt. Die Antikörper und ihre Quellen waren: Anti-HA-Epitop-IgG (monoklonaler Antikörper Klon 16B12 aus der Maus, BAbCO; polyklonaler Antikörper Y-11 aus dem Kaninchen, Santa Cruz Biotechnology), Anti-Kaninchen-Ig-Meerrettichperoxidase-gekoppelter Antikörper und [35 S] anti-Maus-IgG-Antikörper von Amersham Pharmacia Biotech. Antikörper gegen APP: monoklonaler Antikörper IgG 6E10 aus der Maus von Senetek; polyklonaler Antikörper 1736 aus dem Kaninchen und C7 wurden von Dennis J. Selkoe zur Verfügung gestellt. Weitere Chemikalien sind in Tabelle 1 aufgeführt. Sofern nicht anders gekennzeichnet sind sämtliche Lösungen wässrig.

Tabelle 1:

| | |
|--------|---|
| CHAPS: | 3-[(3-Cholamidopropyl)Dimethylammonio]-1-Propansulfonat |
| EPPS: | N-[2-Hydroxyethyl]Piperazin-N'-[3-Propansulfonsäure] |

| | |
|------|---|
| PBS: | 8g/l NaCl; 0,2 g/l KCl; 1,44 g/l Na ₂ HPO ₄ ; 0,24 g/l KH ₂ PO ₄ ; pH 7,0-7,5 |
| PMA: | Phorbol-12-myristat-13-acetat |
| TBS | 8g/l NaCl; 0,2 g/l KCl; 3g/l Tris/HCl; pH 7,0-7,5 |
| TCA | Trichloressigsäure |
| TFA | Trifluoracetat |
| Tris | Tris(Hydroxymethyl)Aminomethan |

Beispiel 1

Reinigung der Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10:

Die Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 wurde aus Rindernierenplasma-
menbranen nach dem Verfahren von Howard und Glynn (Meth. Enzymology
(1995) 248, Seiten 388 bis 395) bis zur Homogenität aufgereinigt. Nach dem
DEAE-Sephacel-Schritt wurden aktive Fraktionen direkt auf eine Hydroxylapatit-
säule aufgegeben, die mit 20mM Tris/HCl pH 7, 0,1 mM K₂HPO₄ und 0,3 %
CHAPS äquilibriert worden war. Aktives Enzym wurde mit 51 mM Kaliumphos-
phat pH 7,0 eluiert. Eine Analyse Enzymaktivität enthaltener Proteinfractionen
mit SDS-PAGE ergab ein Protein mit einem Molekulargewicht von etwa 62.000.
Aminoterminalc Sequenzanalyse ergab eine Aminosäuresequenz von
TTVXEKNTXQLYIQTDXXFF, die identisch mit der von Rinder-MADM ist
(Howard et al. (1996) (Biochem. J. 317, Seiten 45 bis 50) ebenfalls bekannt als
ADAM 10 (Wolfswerk et al. (1995) J. Cell Biol. 131, Seiten 275 bis 278).

Beispiel 2

Proteasetestverfahren zur Bestimmung der Substratspezifität:

Peptide einer Endkonzentration von 0,3 mM wurden mit 2 µg gereinigten Enzym
in 50 µl 50 mM EPPS pH 8,3, 250 mM NaCl bei 37°C 30 Minuten oder 6 Stunden
inkubiert. Die Reaktionen wurden mit 2 µl TFA gestoppt. Meßproben wurden mit
Hilfe von HPLC auf einer Vydac (The Separation Group, Hesperia, Calif. USA)
RP 18 Säule (5 µm, 250 x 4,6 mm) analysiert. Die Peptide wurden mit einem Puf-
fersystem von 0,1 % TFA in Wasser (Puffer A) und 0,1 % TFA, 9,9 % Wasser, 90
% Acetonitril (Puffer B) aufgetrennt, wobei der folgende Gradient angelegt wur-
de: 0 % B, 5 Min.; 0 bis 70 % B innerhalb 45 Min. Das Molekulargewicht der

Proteolyseprodukte wurde mit ESI-Massenspektrometrie bestimmt. Für die Berechnung der prozentualen Spaltung wurde die Peakfläche, die ein Peptid ergab, das ohne Enzym inkubiert und ansonsten identisch behandelt wurde, als Referenz für 100 % herangezogen.

Beispiel 3

Circular dichroism spektroskopie:

CD-Messungen wurden auf einem Jasco J 720 Spektropolarimeter bei 4°C durchgeführt. Die Schichtdicke der Quarzmeßzelle betrug 0,1 mm. Die Messungen wurden bei einer Peptidkonzentration von 0,5 mM in 20 mM Tris/HCl bei pH 8,3, 250 mM NaCl in Anwesenheit von 0,5 % (w/v) SDS durchgeführt. Als Ergebnis wird die Elliptizität $[\theta]$ ($\text{deg} \times 10^{-3}$) aufgeführt.

Beispiel 4

Klonierung und funktionelle Expression der Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10:

PCR-Primer, die auf die Nukleotidsequenz mit der GenBank/EMBL-Datenbank-Zugangsnummer Z21961 passen, wurden benutzt, um die cDNA der Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 aus dem Rind aus einer Rindernieren-cDNA-Bibliothek zu amplifizieren. Die cDNA von ADAM 10 wurde ohne das Original-Stop-Codon amplifiziert. Statt dessen wurde eine KpnI-Schnittstelle eingeführt und für die Fusion der ADAM 10-cDNA mit einer synthetischen DNA-Kassette, die für das Influenza-Hämagglutinin (HA)-Epitop-tag (YPYDVPDYA) codiert, benutzt. Der Vergleich der klonierten Nucleotidsequenz von Rinder-ADAM 10 wurde mit der publizierten Original-Sequenz [Howard et al. (1996) (Biochem. J. 317, Seiten 45 bis 50, GenBank/EMBL-Datenbank-Zugangsnummer Z21961)] verglichen und zeigte die folgenden Austausche: C700T, C2122T und C2251T (die Nukleotidkoordinaten entsprechen der Sequenz mit der Zugangsnummer Z21961). Die Austausche verändern nicht die Aminosäureabfolge.

Zur Expression der carboxyterminal HA-markierten Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 wurde der Expressionsvektor pcDNA3 (Invitrogen BV, Gronningen,

5
10
Niederlande) benutzt. Die stabile Transvektion von HEK-Zellen wurde nach der Calciumphosphat-Präzipitationstechnik durchgeführt. Zur Selektion transfizierter Zellen wurde 1 mg/ml Geneticin benutzt. Die Überexpression von ADAM 10 beschleunigte das Wachstum von transfizierten HEK-Zellen nicht.

5
15
Um die dominante negative Mutante der Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 aus dem Rind (mit DN bezeichnet, siehe Fig. 7, B) herzustellen, wurde eine Aminosäuresubstitution Alanin für Glutamat bei Position 384 (E384A) mittels PCR-Mutagenese durchgeführt (Die Nummerierung der Aminosäuren in der Angabe
10 E384A bezieht sich auf die publizierte Sequenz der Disintegrin Metalloprotease ADAM 10 des Rindes gemäß Howard et al. (1996) Biochem. J. 317, Seiten 45 bis 50, GenBank/EMBL-Datenbank-Zugangsnummer Z21961). Die amplifizierte cDNA der ADAM-10-Mutante wurde in pcDNA3 inkloniert und eine DNA-Kassette, die für ein FLAG-Epitop-tag (DYKDDDDK) am 3'-Ende eingefügt. Die
25 korrekte Sequenz aller PCR-Produkte wurde mit Didesoxynucleotid-Sequenzierung überprüft. HEK-Zellen wurden, wie vorstehend beschrieben, transfiziert und selektiert. Um die Expression der ADAM-10-Mutante zu überprüfen, wurde das Protein mit Western Blot Analyse unter Verwendung eines M2 Anti-FLAG-Antikörpers (Kodak) und dem ECL-Detektionssystem (Amersham Pharmacia Biotech) nachgewiesen.
20

35 Beispiel 5

Reverse Transkriptase – Polymerasekettenreaktion(PCR):

40
25 Gesamt-RNA von MDBK-Zellen (Madin Darby bovine kidney) und HEK-Zellen wurde unter Verwendung des RNeasy Kits (Qiagen GmbH, Hilden) hergestellt. Zur reversen Transkription der menschlichen und der Rinder-ADAM-10 mRNA wurde ein genau passendes Oligonucleotid für das 3'-Ende der mRNAs benutzt (5'-TGCACCGCATGAAAACATC-3'). Die PCR wurde durch Zugabe eines
45 Vorwärtsprimers 5'-GAACAAGGTGAAGAATGTG-3' mit einer Sequenz durchgeführt, die in der menschlichen und in der Rinder-ADAM-10 cDNA identisch ist. Um die Herkunft der amplifizierten Fragmente als revers transkribierte
30
50
55

mRNA sicherzustellen, wurde RNA vor Zugabe der Reversen Transkriptase in einem Kontrollversuch durch RNase A abgebaut.

Beispiel 6

Expression und Deglycosylierung der Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10:

Stabil ADAM 10 exprimierende HEK-Zellen und Vergleichszellen wurden in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) sublimiert mit 10 % fötalem Kälberserum, Penicillin (100 Einheiten pro ml), Streptomycin (100 µg/ml) und 2 mM Glutamin auf Kulturschalen eines Durchmessers von 10 cm bis zur Konfluenz hochgezogen. Die Zellen wurden in 20 Min. auf Eis 1 ml Lysispuffer lysiert (20 mM Imidazol pH 6,8, 0,2 % Triton X-100, 100 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 10 mM EGTA, 300 mM Saccharose, 1 mg/ml BSA) in Anwesenheit eines Inhibitors (completeTM Mini, Boehringer Mannheim). Die geklärten Extrakte wurden mit 6,6 µg/ml monoklonalem anti-HA-Antikörper (16B12) und Protein A-Sepharose bei 4°C über Nacht inkubiert. Für Deglycosylierungsexperimente wurden die Immunkomplexe in 100 µl 1 % SDS und 2 % β-Mercaptoethanol 10 min gekocht. Nach Zentrifugation wurde das Eluat mit 2.500 Einheiten PNGase F (New England Biolabs, Inc., Massachusetts, USA) in 50 mM Natriumphosphat PH 7,5, 1,5 % Nonidet-P40 und 0,25 % SDS 3 Stunden bei 37°C inkubiert. Die Proteine wurden wie bei Wessel und Flügge (1984) (Anal. Biochem. 138, Seiten 141 bis 143) präzipitiert, mit Hilfe eines 4 bis 12 %-igen NuPAGE-Gels (Nowex) getrennt und auf PVDF-Membranen geblottet. Die Membranen wurden mit polyklonalem anti-HA-Antikörper (Y-11) bei einer Verdünnung von 1:1.000 inkubiert, gefolgt von einem sekundären anti-Kaninchen-Meerrettichperoxidase-gekoppelten Antikörper. Die Detektion erfolgte mit Hilfe des ECL-Systems.

Beispiel 7

Zelloberflächenbiotinylierungen:

Die Zellen wurden bis zur 90 %-igen Konfluenz herangezogen und mit PBS enthaltend 0,3 mg/ml Sulfo-NHS-LC-Biotin (Pierce, Rockford, Illinois, USA) 30 Min. bei 4 °C inkubiert. Überschüssiges Biotinylierungsreagenz wurde durch mehrmaliges Waschen mit TBS entfernt. Die Zellysate wurden mit monoklonalem

5 anti-HA-Antikörper wie vorstehend beschrieben immunopräzipitiert. Die Immun-
komplexe wurden von gewaschenen Protein-A- Beads mit 200 µl 100 mM Glycin
10 pH 2,5 und 20 µM kompetierendes HA-Peptid (entsprechend den Aminosäuren 98
bis 108 des Influenza Hämagglutinin-Proteins) eluiert. Die Überstände wurden ge-
5 sammelt und mit 5 µl 3 M Tris pH 8,9 neutralisiert und mit Streptavidin-Agarose-
Beads (Pierce, Rockford, Illinois, USA) zwei Stunden bei 4°C inkubiert. Die Pro-
ben wurden mit Hilfe von 10 % SDS PAGE analysiert und auf PVDF-Membranen
15 geblottet. Die Blots wurden wie vorstehend beschrieben analysiert.

10 Beispiel 8

Immunoblotanalyse:

8·10⁵ HEK und HEK-ADAM10-Zellen (HEK-Zellen, die ADAM 10 stabil expri-
mieren, Verfahren wie oben) wurden auf 5 cm Zellkulturschalen, die mit Poly-L-
Lysin behandelt worden waren, ausgesät und fast bis zu Konfluenz hochgezogen.

15 Das Medium wurde verworfen und die Zellen in Abwesenheit oder Anwesenheit
der aufgeführten Verbindung 4 Stunden in Serum-freien DMEM mit 10 µg/ml
Fettsäure-freiem BSA inkubiert. Das Medium wurde gesammelt und die Proteine
mit 10 % (v/v) TCA präzipitiert. Die Proben wurden bei 14.000 UpM zentrifugiert
30 und die Pellets zweimal mit 500 µl eiskaltem Aceton gewaschen. Die Proteine
wurden mit 7,5 % SDS-PAGE getrennt und auf PVDF-Membranen geblottet. Die
Membranen wurden mit monoklonalem Antikörper 6E10, der die aminoterminal
35 Sequenz von Aβ erkennt, bei einer Verdünnung von 1:2.000 gefolgt von einem
sekundären [³⁵S]-markierten anti-Maus IgG-Antikörper inkubiert. Die radioakti-
ven Banden, die APPsα entsprachen, wurden mit Hilfe des Bio-Imaging-
40 Analysers-BAS-1800 (Fuji) quantifiziert. Der Proteingehalt jeder Zellkulturplatte
wurde nach Dialyse mit dem Mikro-BCA Proteinassay (Pierce, Rockford, Illinois,
USA) bestimmt und die Meßwerte der radioaktiven Banden auf die Proteinmenge
normiert.

30 Beispiel 9

Metabolische Markierung und Immunopräzipitation:

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55

1·10⁶ HEK-Zellen und HEK-ADAM10-Zellen wurden wie oben beschrieben auf 10 cm Zellkulturplatten hochgezogen. Die fast konfluenten Zellkulturen wurden in Serum-freien und Cystein- und Methionin-freiem DMEM 1 Stunde inkubiert, und dann in demselben Medium mit 0,2 mCi/ml Tran[³⁵S]-labelTM (ICN) 5 Stunden markiert. Die Immunopräzipitationen wurden ausgeführt, wie in Haass et al. (1991) (J. Neurosci. 11, Seiten 3.783 bis 3.793) und Haass et al. (1992) (Nature 359, Seiten 322 bis 335) beschrieben. APPS α wurde mit dem α -Sekretase-spezifischen polyklonalen Antikörper 1736 und das 10 kDa-Fragment (p10) mit dem polyklonalen Antikörper C7, der den carboxyterminalen Teil von APP erkennt, immunpräzipitiert. Die Radioaktivität wurde mit Hilfe des Bio-Imaging-Analysers BAS-1800 (Fuji) detektiert.

Beispiel 10

Spezifität der gereinigten Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 für verschiedene Peptidsubstrate.

15
20
25
30
35
40
45
50
55

Als Peptidsubstrat, das die α -Sekretase-Schnittstelle umfaßt, wurde die Octapeptid-Aminosäuresequenz 11 bis 28 von A β gewählt (die Numerierung bezieht sich auf den Aminoterminus des β -Amyloid-Peptids (Esch et al. (1990) Science 248, Seiten 1122 bis 1124 und Haass et al. (1992) Nature 359, Seiten 322 bis 325). Seine carboxyterminale Aminosäure entspricht der ersten extrazellulären Aminosäure von APP. Nach 30 min Inkubation von A β (11-28) mit ADAM 10 zeigte die HPLC-Analyse eine Spaltungsausbeute von 28 % bezogen auf das Startpeptid und unter Bildung von zwei Proteolyseprodukten (siehe Tabelle 2).

Die ESI-massenspektrometrische Analyse identifizierte die Proteolyseprodukte als das aminoterminal Hexapeptid ([M+H]⁺-Ion mit m/z von 777,5) und als das carboxyterminale Dodecapeptidamid ([M+H]⁺-Ion mit m/z von 2.082,8) des ursprünglichen Octadecapeptidamids. Folglich spaltet die Disintegrin-Metalloprotease ADAM-10 proteolytisch zwischen Lys 16 und Leu 17 (Nummerierung beginnend mit dem Aminoterminus von A β), wie es für ein Enzym mit α -Sekretaseaktivität zu erwarten ist. Nach 6-stündiger Inkubation waren 69 % des

5 A β (11-28) vorwiegend an dieser Seite gespalten, seltener erfolgte eine Spaltung hinter Leu 17 und Val 18 (FIG. 3 A; Tabelle 2).

10 Anschließend wurde überprüft, ob die Spaltungshäufigkeit wie für die Spaltung von APP durch die α -Sekretase beschrieben worden ist (siehe Sisodia (1992) Proc. Natl. Acad. Sci USA 89, Seiten 6075 bis 6079) von der Konformation des Substrats abhängt. Zu diesem Zweck wurde Alanin 21 in A β (11-28) durch Lysin ersetzt. Diese Position entspricht einer natürlich vorkommenden Ala \rightarrow Gly-Mutation bei Position 692 von APP₇₇₀ (Hendricks et al. (1992) Nat. Genet. 1, Seiten 218 bis 221), die in Patienten mit zerebraler Hämorrhagie in Folge von Amyloidangiopathie identifiziert wurde (Haass et al (1994) J. Biol. Chem. 269, Seiten 17741 bis 17748; Capell et al. (1996) Amyloid 3, Seiten 150 bis 155).

25 Cirkulardichroismus-Messungen (CD) des Octadecapeptidamids A β (11-28) in 0,5 % SDS zeigten ein Spektrum, das charakteristisch für die α -helicale Konformation ist, während eine Zufallsknäuel-Konformation im Falle des Peptids mit dem Austausch Ala \rightarrow Gly in Position 21 von A β (11-28) (siehe FIG. 3 B) beobachtet wurde. Das letzte Peptid wurde durch die Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 weniger effektiv als das Wildtyp-Peptid gespalten: Nach 30 Min. wurde nur 14 % zwischen Lys 16 und Leu 17 gespalten, verglichen mit 28 % im Falle von A β (11-28) (siehe Tabelle 2). Ein Vergleichsbeispiel zeigt, daß ADAM 10 nicht die Peptidsubstrate spaltet, die eine Schnittstelle für das sog. *Ectodomain Shedding*, das Abwerfen einer Außendomäne, des Angiotensin umwandelnden Enzyms (ACE) (Ehlers et al (1996) Biochemistry 35, Seiten 9549 bis 9559) oder des Interleukin 6-Rezeptors (Müllberg et al. (1994) J. Immunol. 152, Seiten 4958 bis 4968), besitzen. Allerdings spaltet ADAM-10 offensichtlich ein von pro-TNF- α abgeleitetes Peptidsubstrat, wie neulich berichtet wurde (Lunn et al. (1997) FEBS Lett. 400, Seiten 333 bis 335; Rosendahl et al (1997) J. Biol. Chem. 272, Seiten 24588 bis 24593). Einige Metalloproteinase-Inhibitoren wurden auf ihre Fähigkeit, die proteolytische Spaltung von A β (11-28) durch gereinigtes ADAM 10 zu inhibieren, getestet. Der auf einer Hydroxamsäure basierende Inhibitor BB-3103 (Middelhoven et al. (1997) FEBS Lett. 414, Seiten 14 – 18) inhibierte bei einer Kon-

5 zentration von 100 μ M vollständig die proteolytische Spaltungsaktivität. Die Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 wurde auch durch 1 mM DTT vollständig
10 inhibiert, was darauf schließen läßt, daß eine Thiol-Gruppe oder Disulfidbindungen wichtig für die α -Sekretaseaktivität sind. Ferner inhibierte ADAM-10 1 mM
15 1,10-Phenanthrolin.

Beispiel 11

Prozessierung und Lokalisation der Metalloprotease ADAM 10 in HEK-Zellen

Um die Wirkung der Metalloprotease ADAM 10 auf die proteolytische Spaltung
20 von APP in einem Zellsystem zu untersuchen, wurden HEK 293-Zellen eingesetzt. Die cDNA der Metalloprotease ADAM 10 wurde aus einer Rindernieren
cDNA-Bibliothek kloniert, an ihrem 3'- mit einer DNA-Sequenz, die für das HA-Antigen kodiert, versehen und in den Expressionsvektor pcDNA3 (Invitrogen BV,
25 Groningen, Niederlande) kloniert. Nach der Transfektion von HEK-Zellen und
HEK-Zellen, die APP₆₉₅ stabil exprimieren [HEK APP₆₉₅, Haass et al. (1992),
Nature 359, Seiten 322 – 325], mit Nukleinsäure, kodierend für die Metalloprotease ADAM 10, wurden Klone auf die Expression und Prozessierung der Metalloprotease hin untersucht. Zu diesem Zweck wurden Zellysate mit dem monoklonalen anti-HA-Antikörper (16B12) präzipitiert mit SDS-PAGE analysiert und
30 einem Western Blot unterzogen. Immuno-Anfärbungen mit einem anti-HA-polyklonalen Antikörper zeigten 2 immunoreaktive Spezies einer apparenten Größe von 90 kDa und 64 kDa (Fig. 4 A, Spuren 2 – 5). Die 64 kDa-Variante wird aus der 90 kDa-Variante durch Abspaltung der Pro-Domäne (194 Aminosäuren) gebildet. Wahrscheinlich geschieht dies durch eine Furin-ähnliche Pro-
35 Proteinkonvertase, die die Disintegrin-Metalloproteasen bei dem Sequenzmotiv RXKR in einem späten Golgi-Kompartiment spaltet (Lum et al. (1998) J. Biol. Chem. 273, Seiten 26236 – 26247). Die berechnete Molekularmasse der Metalloprotease ADAM 10 nach der proteolytischen Abspaltung der Prodomäne ist 61 kDa. Um zu untersuchen, ob die Differenz zwischen apparenten und berechneten
40 Molekulargewicht auf die Glycosilierung an den putativen N-Glycosilierungsstellen der Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 zurückzuführen ist (Howard et al. 1996) Biochem. J. 317, Seiten 45 – 50), wurden die Glyco-

proteine des Zellklons mit dem höchsten Expressionsspiegel an Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 (HEK-ADAM 10) mit N-Glycosidase F behandelt. Diese Behandlung führte zu einer Reduktion der Molekularmasse auf die erwarteten Werte von etwa 86 kDa für das Vorläuferprotein und von 61 kDa für die prozessierte Variante der Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10, der die Prodomäne fehlt (Fig. 4 A, Spur 3).

Die Lokalisation der Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 in transfizierten HEK-Zellen wurde durch Zelloberflächen-Biotinylierung und konfokale Mikroskopie untersucht. Zur Biotinylierung wurden die Zellen auf 4°C gekühlt und 30 Minuten mit Sulfo-NHS-LC-Biotin, einem membranimpermeablen Biotinylierungsreagenz, inkubiert. Die Immunopräzipitation wurde unter Verwendung eines monoklonalen Anti-HA-Antikörpers durchgeführt. 4/5 der gesammelten Immunopräzipitate wurden mit immobilisiertem Streptavidin inkubiert, um die Proteasemoleküle an der Plasmamembran zu isolieren. Fig. 4 B zeigt die Anwesenheit von sowohl der prozessierten etwa 64 kDa großen Variante der Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 als auch ihres 90 kDa großen Vorläufers auf der Zelloberfläche (Spur A). 1/5 des Immunopräzipitates, das nicht mit Streptavidin inkubiert worden war, zeigte vornehmlich die nicht-prozessierte 90 kDa große Variante, und eine nur schwache Bande wies auf die proteolytisch aktivierte Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 hin (Spur B). Diese Ergebnisse zeigen, daß die proteolytisch aktivierte Form der Metalloprotease ADAM 10 vornehmlich an der Zelloberfläche lokalisiert ist, wo sie in der Lage ist APP proteolytisch zu spalten. Der überwiegende Teil der Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 liegt intrazellulär als Proenzym vor. Eine Analyse der Lokalisation der Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 mit Hilfe von konfokaler Immunofluoreszenzmikroskopie an permeabilisierten HEK-ADAM 10 Zellen zeigte, daß das Anfärbemuster größtenteils mit dem des Golgi-assoziierten Markers 58k überlappt (Ergebnisse nicht gezeigt).

Beispiel 12

Wirkung der Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 auf die α -Sekretase Spaltung von APP in HEK-Zellen.

Die α -Sekretaseaktivität in HEK-ADAM 10 Zellen wurde mit der Aktivität, die in untransfizierten HEK-Zellen gefunden wurde, verglichen. Die Freisetzung von APPs in das Medium wurde mit zwei bindungsortsspezifischen Antikörpern (1736 und 6E10) bestimmt. Beide Antikörper erkennen die aminoterminal Sequenz von A β und detektieren daher nur APPs α aber nicht APPs β . Immunoblotexperimente und Immunopräzipitation nach metabolischer [35 S]-Markierung wurden durchgeführt, um die α -Sekretaseaktivität zu quantifizieren (Fig. 5 und Fig. 6). Die quantitative Analyse der Immunoblotexperimente mit dem monoklonalen Antikörper 6E10 zeigte, daß HEK-Zellen, die stabil einen hohen Spiegel der Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 exprimieren, ungefähr die vierfache Menge APPs α ins Medium abgeben als die untransfizierten HEK-Zellen (Fig. 5, Spuren 1-4). Eine erhöhte α -Sekretaseaktivität wurde auch in einem HEK-APP₆₉₅-Zellklon, der stabil die Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 exprimiert, festgestellt. Der relative Anstieg von APPs₇₅₁ α , welches von endogenem APP abstammt und von APPs₆₉₅ α war nur zweifach (Fig. 5A, Spuren 7 und 8) infolge des geringeren Expressionsspiegels der Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 (Fig. 4, Spur 5) und infolge des höheren Substrat-Enzymverhältnisses.

Neulich wurde gezeigt, daß Zink-Metalloproteaseinhibitoren auf der Basis von Hydroxamsäure das *Ectodomain Shedding* verschiedener Membranproteine einschließlich der α -Sekretase-Spaltung von APP unterdrücken. Ein Effekt auf die Freisetzung von APPs β wurde nicht gefunden (Parvathy et al. (1998) *Biochemistry* 37, Seiten 1680-1685). Deswegen wurde der Effekt des Hydroxamsäureinhibitors BB-3103 auf HEK-Zellen und auf HEK-Zellen, die die Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 überexprimieren, untersucht. BB-3103 verminderte die Freisetzung von APPs α in HEK-Zellen um etwa 40 % (Fig. 5, Spuren 1-3) und in HEK-ADAM 10-Zellen um etwa 70 % (Fig. 5, Spuren 4-6). Die Stimulation der Proteinkinase C durch Phorbol ester verstärkt deutlich die Freisetzung von APPs α und inhibiert die Sekretion von A β . Um die Wirkung der Proteinkinase C

5 auf die Stimulierung der Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10-Aktivität zu un-
tersuchen, wurden HEK- und HEK-ADAM 10-Zellen mit 1 µm PMA behandelt.
10 Immunoblotexperimente zeigten, daß PMA die APP α -Freisetzung von HEK-
Zellen etwa um das 6-fache erhöht (Fig. 5, Spuren 1 und 2). Die verstärkte α -
5 Sekretaseaktivität von HEK-ADAM 10-Zellen wurde um den Faktor 2,5 vergrößert
(Fig. 5, Spuren 4 und 5).

ADAM 10 besitzt in Aminosäureposition 719 ein Threonin, welches als Substrat
für eine Proteinkinase C-abhängige Phosphorylierung dienen kann. Eine Verstär-
20 kung der α -Sekretaseaktivität von ADAM 10 durch den Proteinkinase C-
Aktivator PMA erfolgt offensichtlich über diesen Mechanismus.

25 Ähnliche Ergebnisse wurden in Immunopräzipitationsexperimenten mit dem poly-
klonalen Antikörper 1736 erhalten. Die Expression der Disintegrin-
15 Metalloprotease ADAM 10 in HEK-Zellen verstärkte signifikant die Sekretion
von APP α in das Medium (Fig. 6A). Um zu bestimmen, ob die Expression der
Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 auch den Spiegel von p10 erhöht, wurden
30 Zellysate von HEK- und HEK-ADAM 10-Zellen nach metabolischer Markierung
mit dem polyklonalen Antikörper C7, der den carboxyterminalen Teil von APP
20 erkennt, immunopräzipitiert. Wie in Fig. 6B und 6C gezeigt, wird die Expression
von Holo-APP (APP der vollen Länge) nicht verändert, während das Signal von
35 p10 in HEK-ADAM 10-Zellen signifikant stärker ist als in den Vergleichszellen.
Dies zeigt, daß die Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 α -Sekretaseaktivität
40 besitzt.

Beispiel 13

Wirkung der dominant negativen Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10-Mutante auf die α -Sekretaseaktivität:

50 Um festzustellen, ob das menschliche Homologe der Disintegrin-Metalloprotease
ADAM 10 in HEK-Zellen exprimiert wird und daher für die endogene α -

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55

Sekretaseaktivität verantwortlich ist, wurden Reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktionsanalysen unter Verwendung von Gesamt-RNA aus diesen Zellen und Oligonucleotiden, die spezifisch für ADAM 10 sind, durchgeführt. Wie in Fig. 7A gezeigt, exprimieren HEK-Zellen detektierbare Mengen an mRNA, die für die humane Variante der Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 codiert, die 97 % Identität auf Aminosäureebene mit der Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 aus dem Rind zeigt. In einem Vergleichsexperiment wurde die Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10-mRNA in Gesamt-RNA von MDBK-Zellen nachgewiesen, von denen bekannt ist, daß sie die Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 exprimieren (Howard et al. (1996) Biochem. J. 317, Seiten 45-50).

Um die endogene α -Sekretaseaktivität in HEK-Zellen zu inhibieren, wurde die Punktmutation E384A in die Zink-Bindungsstelle der Rinder-Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 eingeführt. Eine Mutante des KUZ-Proteins mit einer Mutation an derselben Stelle verhielt sich dominant negativ in *Drosophila melanogaster* (Pan und Rubin (1997) Cell 90, Seiten 271-280). HEK-Zellen, die die Mutante ADAM 10 E384A (HEK/DN) exprimieren, zeigten eine deutlich verminderte Sekretion von APPs. Der inhibitorische Effekt war am deutlichsten in PMA-behandelten Zellen: Nur 25 % der enzymatischen Aktivität wurde festgestellt (Fig. 7B, Spuren 2 und 4; Fig. 7C). Folglich führte diese Punktmutation zu einer dominant negativen Form der Protease und zu einer deutlich verminderten konstitutiven und stimulierbaren α -Sekretaseaktivität.

Zusammenfassend läßt sich also sagen, daß die Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 α -Sekretaseaktivität besitzt und in den basalen und stimulierten Prozeß des *Ectodomain Sheddings* von APP involviert ist. Diese Folgerung ergibt sich im wesentlichen aus folgenden experimentellen Ergebnissen:

- Die Überexpression der Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 in HEK-Zellen führt zu einem Anstieg von APPs α und p10 um ein vielfaches. Der Anstieg in der Proteolyseaktivität (*Shedding*-Aktivität)

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

korreliert mit dem Expressionslevel der Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10. Die verstärkte α -Sekretaseaktivität kann durch Stimulation der Proteinkinase C mit Phorbolestern erhöht werden, was ein charakteristisches Merkmal der α -Sekretase ist (HUNG et al. (1993) J. Biol. Chem. 268, Seiten 22959-22962).

5

10

15

20

- Zelloberflächen-Biotinylierungsexperimente zeigen, daß die proteolytisch aktivierte Form der Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 im wesentlichen in der Plasmamembranen lokalisiert ist.

- Die endogene basale und Phorbol ester stimulierte α -Sekretaseaktivität in HEK-Zellen kann durch eine dominant negative Form der Disintegrin Metalloprotease ADAM 10 deutlich inhibiert werden.

- Das Inhibitorspektrum sowohl des isolierten als auch des überexprimierten Enzyms stimmt mit den Berichten über die Hemmung der α -Sekretaseaktivität überein.

Auf die Veröffentlichung Lammich *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci USA (1999) 96, 3922-7 wird vollinhaltlich verwiesen.

Tabelle 2

| Protein | Sequenz | % Spaltung durch Rinder-ADAM 10 nach | |
|-------------------------------------|-------------------------------------|---|-----|
| | | 30 min | 6 h |
| Pro-TNF | PLAQA↓VRSSSRTPSD-NH ₂ | 49 | 100 |
| β-Amyloidvorläuferprotein | EVHHQK↓LVFFAEDVGSNK-NH ₂ | 28 | 69 |
| | EVHHQK↓LVFFGEDVGSNK-NH ₂ | | |
| IL-6-Rezeptor | ANATFLPVQ↓DSSSV-NH ₂ | 14 | 54 |
| Angiotensin umwan- delndes Enzym | TPNSAR↓SEGPLDSDGR-NH ₂ | 0 | 0 |

Claims

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

5

10

Patentansprüche

15

20

25

30

35

40

45

50

55

1. Rekombinante Zelle, die ein Substratprotein exprimiert, das mindestens einen Sequenzbereich von 18 Aminosäuren des humanen Amyloidvorläuferproteins (APP, amyloid precursor protein) oder eines homologen Proteins umfaßt, wobei der Sequenzbereich die α -Sekretasespaltstelle sowie 6 Aminosäurereste aminoterminal und 12 Aminosäurereste carboxyterminal bezogen auf die α -Sekretasespaltstelle enthält, und
 - a) entweder rekombinante Nukleinsäure enthält, umfassend mindestens ein Gen für ein Proteaseprotein, das entweder mindestens den/die für die proteolytische Aktivität notwendigen Sequenzbereich oder Sequenzbereiche der Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 aus dem Rind (*Bos taurus*), aus dem Menschen oder aus einem anderen Säugetier umfaßt oder ein Mutein einer Säugetier Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 darstellt, das im wesentlichen die gleichen enzymatischen Eigenschaften besitzt, wobei das Gen oder die Gene unter der Kontrolle eines heterologen Promotors stehen,
 - b) oder heterologe RNA codierend für ein Substratprotein und für ein Proteaseprotein.
2. Rekombinante Zelle, dadurch gekennzeichnet, daß sie rekombinante Nukleinsäure enthält, umfassend entweder
 - a) mindestens ein Gen für ein Substratprotein, das mindestens einen Sequenzbereich von 18 Aminosäuren des humanen Amyloidvorläuferproteins (APP, amyloid precursor protein) oder eines homologen Proteins umfaßt, wobei der Sequenzbereich die α -Sekretasespaltstelle sowie 6 Aminosäurereste aminoterminal und 12 Aminosäurereste carboxyterminal bezogen auf die α -Sekretasespaltstelle enthält, und
 - b) mindestens ein Gen für ein Proteaseprotein, das entweder mindestens den/die für die proteolytische Aktivität notwendigen Sequenzbereich oder Sequenzbereiche der Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 aus dem Rind (*Bos taurus*), aus dem Menschen oder aus einem anderen Säugetier umfaßt oder ein Mutein einer Säugetier Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 darstellt, das im wesentlichen die gleichen enzymatischen Eigenschaften besitzt, wobei das Gen oder die Gene unter der Kontrolle eines heterologen Promotors stehen,oder heterologe RNA codierend für ein Substratprotein und für ein Proteaseprotein.
3. Zelle nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß das Proteaseprotein die Di-

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55

sintegrin-Metalloprotease ADAM 10 der Maus ist.

4. Zelle nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß das Proteaseprotein die Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 der Ratte ist.
5. Rekombinante Zelle, dadurch gekennzeichnet, daß sie rekombinante Nukleinsäure(n) enthält, die codieren:
 - c) für eine dominant negative Form der Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 aus dem Rind (*Bos taurus*), aus dem Menschen oder aus einem anderen Säugetier und
 - d) gegebenenfalls für ein Substratprotein gemäß Anspruch 2.
6. Zelle, nach Anspruch 5, wobei es sich bei der dominant negativen Form der Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 um die Mutante E384A der Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 aus dem Rind oder um eine entsprechende Mutante aus dem Menschen oder aus einem anderen Säugetier handelt.
7. Zelle nach einem der Ansprüche 2 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß das Substratprotein ein Fusionsprotein ist, bei dem der aminoterminal Sequenzbereich des Fusionsproteins von einem Markerprotein, einem Enzym oder einem katalytisch wirksamen Teil eines Enzyms und der carboxyterminale Sequenzbereich des Fusionsproteins von dem humanen Amyloidvorläuferprotein oder einem Teil des humanen Amyloidvorläuferproteins gebildet werden.
8. Zelle nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei dem Enzym um eine um mindestens 24 Aminosäurereste carboxyterminal verkürzte alkalische Phosphatase SEAP handelt.
9. Zelle nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß das Substratprotein eine Sequenz gemäß SEQ ID-No:1 aufweist.
10. Verfahren zur Auffindung pharmazeutischer Wirksubstanzen, gekennzeichnet durch die folgenden Schritte
 - e) Bereitstellung eines Substratproteins gemäß Anspruch 2,
 - f) Bereitstellung eines Proteaseproteins gemäß Anspruch 2,
 - g) Applikation einer Testsubstanz auf eine Zelle, auf eine Zellfraktion oder auf ein Gemisch von Zellfraktionen, die jeweils sowohl das Substratprotein als auch das Protea-

5

seprotein umfassen, und

10

- h) Quantitative Bestimmung eines seit der Applikation der Testsubstanz gebildeten Proteolyseproduktes des Substratproteins.

15

11. Verfahren zur Auffindung von weiteren Sekretasen oder von pharmazeutischen Wirksubstanzen, umfassend die folgenden Schritte

20

- d) Expression eines Substratproteins und einer dominant negativen Form der Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 aus dem Rind (*Bos taurus*), aus dem Menschen oder aus einem anderen Säugetier in einer Zelle gemäß Anspruch 5 oder 6.
e) Expression eines weiteren Testproteins in der Zelle und/oder Applikation einer Testsubstanz auf die Zelle oder auf eine Zellfraktion dieser Zelle, und
f) Quantitative Bestimmung eines gebildeten Proteolyseproduktes des Substratproteins.

25

12. Verfahren nach einem der Ansprüche 10 und 11, dadurch gekennzeichnet, daß die quantitative Bestimmung des Proteolyseproduktes durch einen enzymatischen Test erfolgt, bei dem von der katalytischen Aktivität einer Probe auf die Menge an einem bestimmten Proteolyseprodukt in der Probe geschlossen wird.

30

13. Verfahren nach einem der Ansprüche 10 und 11, dadurch gekennzeichnet, daß die quantitative Bestimmung des Proteolyseproduktes durch einen spektroskopischen Test erfolgt, bei dem von der spektroskopischen Eigenschaft einer Probe auf die Menge an einem bestimmten Proteolyseprodukt in der Probe geschlossen wird.

35

14. Verwendung von Substanzen, die die von der Zelle gebildete Proteinmenge oder die enzymatische Aktivität eines Proteaseproteins gemäß Anspruch 1 oder 2 beeinflussen, zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung neurodegenerativer Erkrankungen, insbesondere von *Morbus Alzheimer*.

40

15. Verwendung eines Proteaseproteins gemäß Anspruch 1 oder 2 zur proteolytischen Spaltung eines Substratproteins gemäß Anspruch 1 oder 2.

45

16. Verwendung einer dominant negativen Form der Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 aus dem Rind (*Bos taurus*), aus dem Menschen oder aus einem anderen Säugetier oder einer Nukleinsäure, codierend für eine dieser dominant negativen Formen, zur Unterdrückung der α -Sekretaseaktivität einer Zelle.

50

17. Verfahren zur Bestimmung des Risikofaktors für neurodegenerative Erkrankungen, insbe-

55

sondere für *Morbus Alzheimer*, dadurch gekennzeichnet, daß

- c) eine DNA-Probe der Testperson unter Einsatz genspezifischer Primer gegen die humane Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 der PCR-Analyse unterworfen wird,
- d) und die Sequenz des Amplifikationsproduktes mit der bekannten Sequenz der humanen Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 verglichen wird.

18. Verfahren zur Bestimmung des Risikofaktors für neurodegenerative Erkrankungen, insbesondere für *Morbus Alzheimer*, durch quantitative Bestimmung der mRNA-Mengen von humanem ADAM 10 aus Zell- und Gewebeproben, umfassend einen der folgenden Schritte:

- d) Isolierung und Quantifizierung der ADAM 10-mRNA,
- e) Einzel- oder doppelsträngige cDNA die ADAM 10-mRNA umgeschrieben wird welche dann quantifiziert wird,
- f) die ganze Nukleotidsequenz von ADAM 10 oder Teile davon zur Quantifizierung mittels Hochdurchsatz-Expressionsanalyse (z.B. DNA-Chip-Technologie u. DNA-Micro-Array) eingesetzt wird.

19. Verfahren zur Bestimmung des Risikofaktors für neurodegenerative Erkrankungen, insbesondere für *Morbus Alzheimer*, dadurch gekennzeichnet, daß die tatsächliche chromosomalen Lokalisierung des Gens der Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 mit seiner normalen chromosomalen Lokalisierung, Chromosom 15 bei 12.44 cR₃₀₀₀, verglichen wird.

20. Arzneimittel, enthaltend eine rekombinante Nukleinsäure, die für ein Proteaseprotein gemäß Anspruch 1 oder 2 codiert.

21. Arzneimittel, enthaltend eine zu einer Nukleinsäure, die für ADAM 10 eines Säugetiers codiert, mindestens über einen Abschnitt von 10 Basen komplementäre rekombinante Nukleinsäure

22. Arzneimittel, umfassend die nicht-membranverankerte lösliche Form eines Proteaseproteins gemäß Anspruch 1 oder 2, insbesondere die lösliche Form von humanem ADAM 10.

23. Antikörper oder Antikörperderivate, die ein Proteaseprotein gemäß Anspruch 1 oder 2

5

spezifisch binden.

10

24. Verfahren zur Bestimmung des Aktivitätszustands von humanem ADAM 10 durch Quantifizierung des Phosphorylierungsgrades von humanem ADAM 10 in Zell- und Gewebeproben, wobei entweder

15

c) ADAM 10 isoliert wird und sein Phosphorylierungsgrad entweder durch Massenspektrometrie, durch spezifische Anti-Phosphothreonin-Antikörper, durch Quantifizierung der Aminosäure Phosphothreonin oder durch Dephosphorylierung (Phosphatase-Assay) von ADAM 10 bestimmt wird, oder

20

d) Zell- oder Gewebeproben direkt in eine Proteomanalyse eingesetzt werden und der Nachweis von phosphoryliertem ADAM 10 wie unter Punkt a) beschrieben erfolgt.

25

25. Transgenes nicht-menschliches Tier, das rekombinante Nukleinsäure, codierend für ein Proteaseprotein gemäß Anspruch 1 oder 2 oder für eine dominant negative Form der Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 aus dem Rind (*Bos taurus*), aus dem Menschen oder aus einem anderen Säugetier aufweist.

30

26. Verwendung einer rekombinanten Nukleinsäure, codierend für ein Proteaseprotein gemäß Anspruch 1 oder 2 oder für eine dominant negative Form der Disintegrin-Metalloprotease ADAM 10 aus dem Rind (*Bos taurus*), aus dem Menschen oder aus einem anderen Säugetier zur Erzeugung transgener Zellen und transgener nicht-menschlicher Tiere und zur Gentherapie.

35

27. Transgenes nicht-menschliches Tier, aufweisend eine zu einer Nukleinsäure, die für ADAM 10 eines Säugetiers codiert, mindestens über einen Abschnitt von 10 Basen komplementäre rekombinante Nukleinsäure.

40

28. Verwendung einer zu einer Nukleinsäure, die für ADAM 10 eines Säugetiers codiert, mindestens über einen Abschnitt von 10 Basen komplementäre rekombinante Nukleinsäure zur Erzeugung von transgenen Zellen und transgenen nichtmenschlichen Tieren und zur Gentherapie.

45

50

55

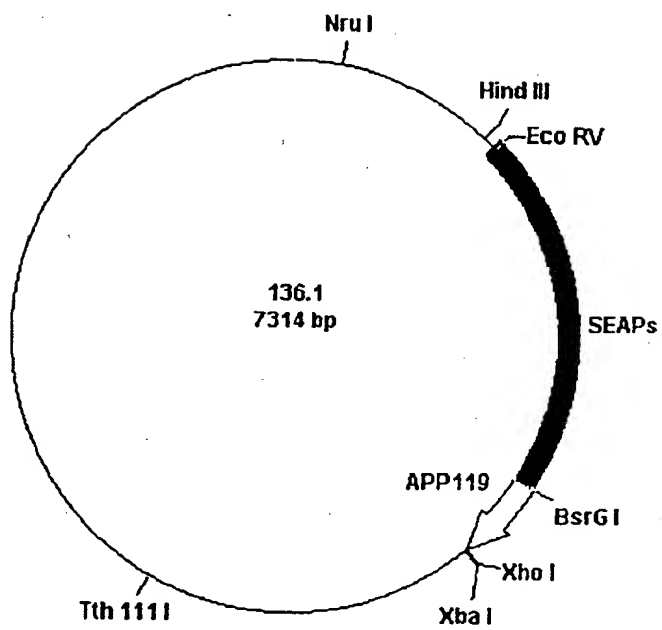


Fig.1

136.1 = pcDNA3-SEAPs/APP119

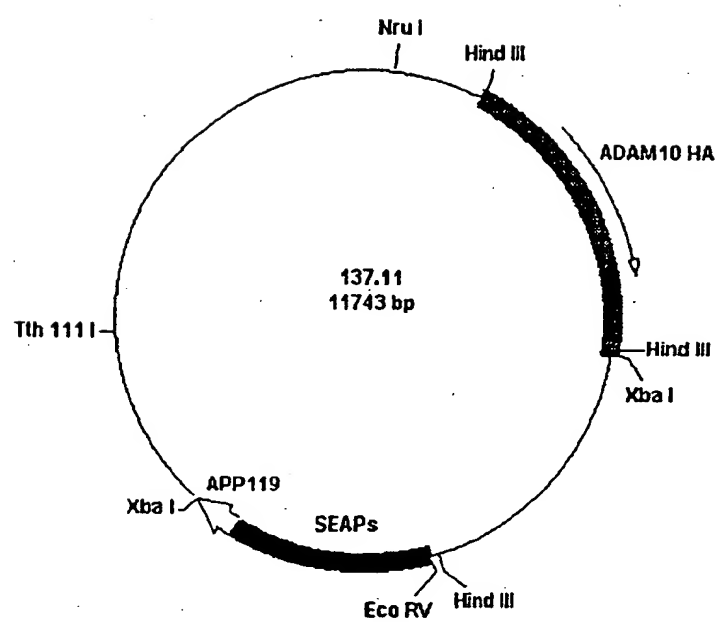


Fig.2

137.11 = pcDNA3-SEAPs/APP119_ADAM10-HA

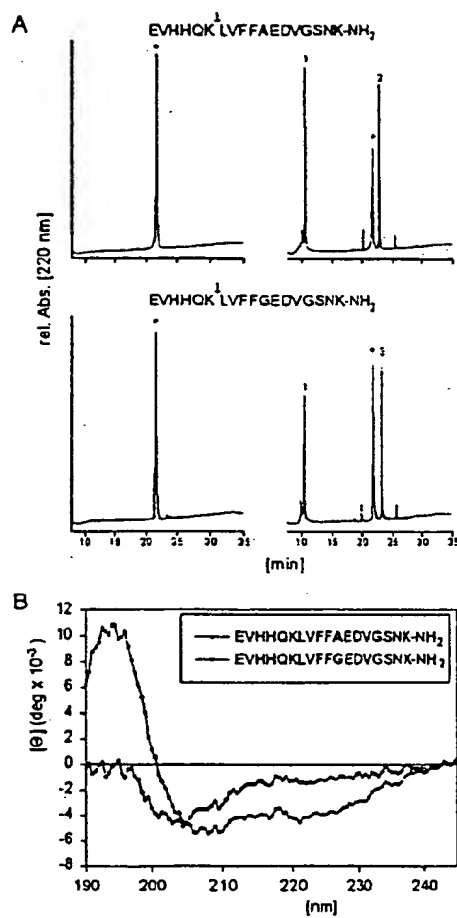


Fig. 3

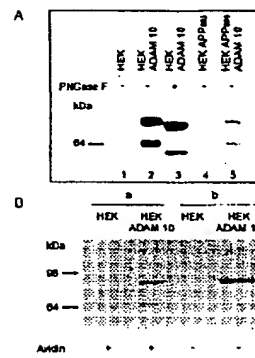


Fig.4

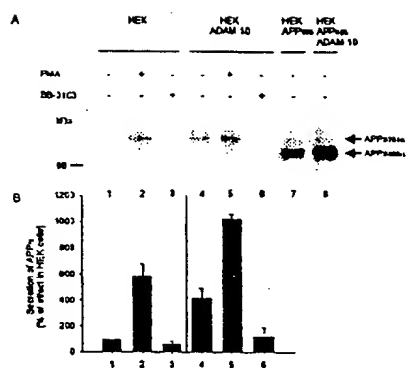


Fig. 5

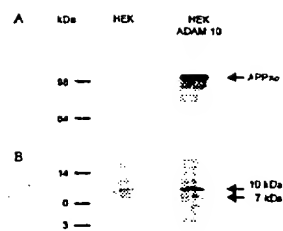


Fig. 6

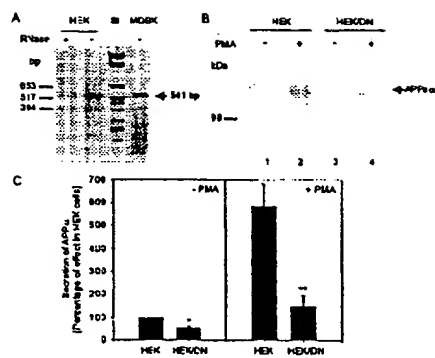


Fig. 7

SEQUENZPROTOKOLL

ALLGEMEINE ANGABEN:

ANMELDER:

NAME: Professor Falk Fahrenholz
STRASSE: Becherweg 30
BUNDESLAND: Rheinland-Pfalz
LAND: Deutschland
POSTLEITZAHL: 55099
TELEFON: 06131395833
TELEFAX: 06131395348

BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG:

Zellen, die ein Amyloidvorläuferprotein und eine alpha-Sekretase coexprimieren, ein Testverfahren zur Identifikation alpha-Sekretase-aktiver Substanzen sowie eines zur Identifikation weiterer Sekretasen, ein Testverfahren zur Bestimmung der Anfälligkeit gegenüber Morbus Alzheimer und Verwendung von Nukleinsäuren, die für eine alpha-Sekretase codieren, für die Gentherapie

ANZAHL DER SEQUENZEN: 2

COMPUTERLESBARE FASSUNG:
DATENTRÄGER: Diskette
COMPUTER: IBM-kompatibel
BETRIEBSSYSTEM: WINDOWS NT
SOFTWARE: WORD97

ANGABEN ZU SEQ ID-NO:1:

SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
LÄNGE: 627 Aminosäuren
ART: Aminosäure
TOPOLOGIE: linear

ART DES MOLEKÜLS: Protein

SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID-No:1:

| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Met | Leu | Leu | Leu | Leu | Leu | Leu | Gly | Leu | Arg | Leu | Gln | Leu | Ser | 5 | 10 | 15 | |
| Leu | Gly | Ile | Ile | Pro | Val | Glu | Glu | Glu | Asn | Pro | Asp | Phe | Trp | Asn | 20 | 25 | 30 |
| Arg | Glu | Ala | Ala | Glu | Ala | Leu | Gly | Ala | Ala | Lys | Lys | Leu | Gln | Pro | 35 | 40 | 45 |
| Ala | Gln | Thr | Ala | Ala | Lys | Asn | Leu | Ile | Ile | Phe | Leu | Gly | Asp | Gly | 50 | 55 | 60 |
| Met | Gly | Val | Ser | Thr | Val | Thr | Ala | Ala | Arg | Ile | Leu | Lys | Gly | Gln | 65 | 70 | 75 |
| Lys | Lys | Asp | Lys | Leu | Gly | Pro | Glu | Ile | Pro | Leu | Ala | Met | Asp | Arg | 80 | 85 | 90 |
| Phe | Pro | Tyr | Val | Ala | Leu | Ser | Lys | Thr | Tyr | Asn | Val | Asp | Lys | His | 95 | 100 | 105 |
| Val | Pro | Asp | Ser | Gly | Ala | Thr | Ala | Thr | Ala | Tyr | Leu | Cys | Gly | Val | 110 | 115 | 120 |
| Lys | Gly | Asn | Phe | Gln | Thr | Ile | Gly | Leu | Ser | Ala | Ala | Ala | Arg | Phe | 125 | 130 | 135 |
| Asn | Gln | Cys | Asn | Thr | Thr | Arg | Gly | Asn | Glu | Val | Ile | Ser | Val | Met | 140 | 145 | 150 |
| Asn | Arg | Ala | Lys | Lys | Ala | Gly | Lys | Ser | Val | Gly | Val | Val | Thr | Thr | 155 | 160 | 165 |
| Thr | Arg | Val | Gln | His | Ala | Ser | Pro | Ala | Gly | Thr | Tyr | Ala | His | Thr | 170 | 175 | 180 |
| Val | Asn | Arg | Asn | Trp | Tyr | Ser | Asp | Ala | Asp | Val | Pro | Ala | Ser | Ala | 185 | 190 | 195 |
| Arg | Gln | Glu | Gly | Cys | Gln | Asp | Ile | Ala | Thr | Gln | Leu | Ile | Ser | Asn | 200 | 205 | 210 |
| Met | Asp | Ile | Asp | Val | Ile | Leu | Gly | Gly | Gly | Arg | Lys | Tyr | Met | Phe | 215 | 220 | 225 |
| Arg | Met | Gly | Thr | Pro | Asp | Pro | Glu | Tyr | Pro | Asp | Asp | Tyr | Ser | Gln | 230 | 235 | 240 |
| Gly | Gly | Thr | Arg | Leu | Asp | Gly | Lys | Asn | Leu | Val | Gln | Glu | Trp | Leu | 245 | 250 | 255 |
| Ala | Lys | Arg | Gln | Gly | Ala | Arg | Tyr | Val | Trp | Asn | Arg | Thr | Glu | Leu | 260 | 265 | 270 |
| Met | Gln | Ala | Ser | Leu | Asp | Pro | Ser | Val | Thr | His | Leu | Met | Gly | Leu | 275 | 280 | 285 |
| Phe | Glu | Pro | Gly | Asp | Met | Lys | Tyr | Glu | Ile | His | Arg | Asp | Ser | Thr | 290 | 295 | 300 |
| Leu | Asp | Pro | Ser | Leu | Met | Glu | Met | Thr | Glu | Ala | Ala | Leu | Arg | Leu | 305 | 310 | 315 |
| Leu | Ser | Arg | Asn | Pro | Arg | Gly | Phe | Phe | Leu | Phe | Val | Glu | Gly | Gly | 320 | 325 | 330 |
| Arg | Ile | Asp | His | Gly | His | His | Glu | Ser | Arg | Ala | Tyr | Arg | Ala | Leu | 335 | 340 | 345 |
| Thr | Glu | Thr | Ile | Met | Phe | Asp | Asp | Ala | Ile | Glu | Arg | Ala | Gly | Gln | 350 | 355 | 360 |
| Leu | Thr | Ser | Glu | Glu | Asp | Thr | Leu | Ser | Leu | Val | Thr | Ala | Asp | His | 365 | 370 | 375 |
| Ser | His | Val | Phe | Ser | Phe | Gly | Gly | Tyr | Pro | Leu | Arg | Gly | Ser | Ser | 380 | 385 | 390 |

```

Ile Phe Gly Leu Ala Pro Gly Lys Ala Arg Asp Arg Lys Ala Tyr
    395                      400                      405
Thr Val Leu Leu Tyr Gly Asn Gly Pro Gly Tyr Val Leu Lys Asp
    410                      415                      420
Gly Ala Arg Pro Asp Val Thr Glu Ser Glu Ser Gly Ser Pro Glu
    425                      430                      435
Tyr Arg Gln Gln Ser Ala Val Pro Leu Asp Glu Glu Thr His Ala
    440                      445                      450
Gly Glu Asp Val Ala Val Phe Ala Arg Gly Pro Gln Ala His Leu
    455                      460                      465
Val His Gly Val Gln Glu Gln Thr Phe Ile Ala His Val Met Ala
    470                      475                      480
Phe Ala Ala Cys Leu Glu Pro Tyr Thr Ala Cys Asp Leu Ala Pro
    485                      490                      495
Pro Ala Gly Thr Thr Asp Ala Ala His Pro Gly Val Tyr Thr Arg
    500                      505                      510
Pro Gly Ser Gly Leu Thr Asn Ile Lys Thr Glu Glu Ile Ser Glu
    515                      520                      525
Val Lys Met Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val
    530                      535                      540
His His Gln Lys Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn
    545                      550                      555
Lys Gly Ala Ile Ile Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala
    560                      565                      570
Thr Val Ile Val Ile Thr Leu Val Met Leu Lys Lys Lys Gln Tyr
    575                      580                      585
Thr Ser Ile His His Gly Val Val Glu Val Asp Ala Ala Val Thr
    590                      595                      600
Pro Glu Glu Arg His Leu Ser Lys Met Gln Gln Asn Gly Tyr Glu
    605                      610                      615
Asn Pro Thr Tyr Lys Phe Phe Glu Gln Met Gln Asn
    620                      625

```

ANGABEN ZU SEQ ID-NO:2:

SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

```

  LANGE: 1884 Basenpaare
  ART: Nucleinsäure
  STRANGFORM: Einzelstrang
  TOPOLOGIE: linear

```

ART DES MOLEKÜLS: c-DNA zu m-RNA

SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID-No:2:

```

ATGCTGCTGC TGCTGCTGCT GCTGGGCCTG AGGCTACAGC TCTCCCTGGG CATCATCCCA    60
GTTGAGGAGG AGAACCCGGA CTTCTGSPAC CGCGAGGCAG CCGAGGCCCT GGGTGCCGCC    120
AAGAAGCTGC AGCCTGCACA GACAGCCGCC AAGAACCTCA TCATCTCCT GGGCGATGGG    180
ATCGGGGTGT CTACGCTGAC AGCTGCCAGG ATCCTAAAG GGCAGAAGAA GGACAACTG    240
GGGCCTGAGA TACCCCTGSC CATGGACCGC TTCCCATATG TGGCTCTGTC CAAGACATAC    300

```

AATGTAGACA AACATGTGCC AGACAGTGGG GCCACAGCCA CGGCTTACCT GTGCGGGGTC 360
AAGGGCAACT TCCAGACCAT TGGCTTGAGT GCAGCCGCCC GCTTTACCA GTGCAACACG 420
ACACGCGECA ACGAGGTGAT CTCCTGATG ATCGGGCCA AGAAAGCAGG GAGTCAGTG 480
GGATGGTAA CCACCACAG AGTCAGCAC GCTCGCCAG CCGGCACCTA CGCCACACG 540
GTGAACCECA ACTGGTACTC GGACGCCGAC GTGCTGCTT CGGCCGCCA GGAGGGGTGC 600
CAGGACATCG CTACGCAGCT CATCTCAAC ATGACATTG ACGTGATCCT AGGTGGAGGC 660
CGAAAGTACA TGTTCGCAI GGGAAACCCA GACCTGAGT ACCCAATGA CTACAGCCAA 720
GGTGGGACCA GGCTGGACGG GAAGAATCTG GTGAGGAAT GGCTGGCGAA GCGCCAGGGT 780
GCCCGGTATG TGTGAACCG CACTGAGCTC ATGAGGCTT CCTGGACCC GTCTGTGACC 840
CATCTCATGG GTCTCTTGA GCCTGGAGAC ATGAAATACG AGATCCACCG AGACTCCACA 900
CTGGACCCCT CCTGATGGA GATGACAGAG GCTGCCCTGC GCCTGCTGAG CAGGAACCCC 960
CGCGGCTTCT TCCCTCTCGT GGAGGGTGGT CCGATCGACC ATGGTCATCA TGAAGCAGG 1000
GCTTACCGGG CACTGACTGA GACGATCATG TTCGACGACG CCATTGAGAG GCGGGGCCAG 1060
CTCACCAGCG AGGAGGACAC GCTGAGCTC GTCAGTCCG ACCACTCCCA CGTCTTCTCC 1120
TTCGGAGGCT ACCCCCTGCG AGGGAGCTCC ATCTTCGGGC TGGCCCTGG CAGGCCCCGG 1180
GACAGGAAGC CCTACAGGT CCTCTATAC GGAACGGTC CAGGCTATGT GCTCAAGGAC 1240
GGCGCCCGGC CGGATGTTAC CGAGAGCGAG AGCGGGAGTC CGGAGTATCG GCAGCAGTCA 1300
GCAGTGCCCC TGGACGAAGA GACCCACGCA GCGGAGGACG TGGCGGTGTT CGCGCGCGGC 1360
CCGAGGCGC ACCTGGTICA CGCGGTGAG GAGCAGACCT TCATAGCGCA CGTCATGGCC 1420
TTCGCGCCT GCCTGGAGCC CTACACGCC TCGACCTGG CGCCCCCGC CGGCACCACC 1480
GACGCCGCGC ACCCGGGGT GTACACTCGA CCAGGTTCTG GGTTGACAAA TATCAAGACG 1540
GAGGAGATCT CTGAAGTGAA GATGGATGCA GAATTCGAC ATGACTCAGG ATATGAAGTT 1600
CATCATCAA AATTGTTGT CTTTCAGAA GATGTGGGT CAAACAAAGG TGCAATCATT 1660
GGACTCATGG TGGCGGTGT TGTATAGCG ACAGTGATCG TCATCACCTT GGTGATGCTG 1720
AAGAGAAAC AGTACATC CATTATCAT GGTGTGGTGG AGGTTGACG CGCTGTACC 1780
CCAGAGGAGC GCCACCTGTC CAAGATGAG CAGAACGGCT ACGAAATCC AACCTACAG 1860
TTCTTTGAGC AGATGCAGAA CTAG

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☒ **BLACK BORDERS**

☒ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**

☐ **FADED TEXT OR DRAWING**

☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**

☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**

☒ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**

☒ **GRAY SCALE DOCUMENTS**

☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**

☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**

☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.